



## CHANG Marrow Bone Marrow Culture Medium with Gentamicin

Catalog No. 91031

100mL, 500mL

For *in vitro* diagnostic use.

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Pour diagnostics *in vitro*.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Til *in vitro*-diagnostik.

*In vitro* -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* diagnostikai alkalmazáshoz.

Skirta *in vitro* diagnostikai.

*In vitro* diagnostik kullanim için.

Na diagnostické použití *in vitro*.

За *in vitro* диагностична употреба.

Za upotrebu u *in vitro* dijagnostici.

Ghal užu dijanjostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

### REFERENCES

Tijo, JH, and Whang-Peng, J: Direct Preparation of Bone Marrow Cells. Human Chromosome Methodology (JJ Yunis, ed.), Academic Press, New York, 1974.

Hozier, JC, and Lindquist, L: Banded Karyotypes from Bone Marrow: A Clinically Useful Approach. Human Genetics, 53:205-209, 1980.

Williams, DL, et al: A Direct Bone Marrow Chromosome Technique for Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics, 13:239-257, 1984.

Babior, B, and Stossel, T: Hematology, A Pathophysiological Approach, Churchill-Livingstone, Inc., New York 1990.

LeBeau, M: Cytogenetic Analysis of Hematologic Malignant Diseases. ACT Cytogenetics Laboratory Manual, Raven Press, New York, 1991.

Mitelman, F.: Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer (4<sup>th</sup> ed.), Alan Liss, New York, 1991.

Kaplan, B, and Dale, K (eds): The ACT Cytogenetic Symposia, CA 1994.

Mitelman, F, and Heim, S: Cancer Cytogenetics, Wiley-Liss, New York, 1995.

**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

© 2019 FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.. All rights reserved. The FUJIFILM Irvine Scientific logo and CHANG Marrow are trademarks of FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. in various jurisdictions. PN 40955 Rev. 4

### ENGLISH

#### INDICATION FOR USE

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

#### DEVICE DESCRIPTION

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

#### COMPONENTS

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

#### QUALITY ASSURANCE

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

#### MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

#### PREPARATION FOR USE

CHANG Marrow 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.

#### INSTRUCTIONS FOR USE

Sample Preparation:

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

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

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

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

#### Bone Marrow Culture:

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

1. 10.0 mL CHANG Marrow
2. Equilibrate flask to 37°C before inoculation of specimen
3. Using a hemocytometer, perform a white blood cell (WBC) count of the sample. Inoculate each culture with appropriate amount of sample to achieve an optimal concentration of 1 X 10<sup>6</sup> cells/mL or 10 X 10<sup>6</sup> cells per 10 mL culture.
4. Each individual laboratory should determine the number of cultures to set up depending on clinical indication of patient. Additional growth factors may be added if desired. Place all of the flasks in a 37°C incubator until ready to harvest.

#### Harvesting the Cultures:

1. Remove cultures from incubator and gently swirl to resuspend cells.
2. Transfer the contents of each flask to a 15 mL centrifuge tube.
3. Add 100 µL of stock Colcemid (10 µg/mL) to each tube.
4. Cap tubes and mix by inverting.
5. Incubate tubes at 37°C for 20 minutes.
6. After incubation, centrifuge tubes for 8 minutes at 1200 rpm (300 x g).
7. Carefully aspirate supernatant from each tube.
8. Resuspend the cell pellet by gently mixing, or flicking the bottom of the tube with forefinger.
9. VERY SLOWLY add 10 mL of hypotonic solution (0.075 M Potassium Chloride) to each tube while vortexing (on the lowest setting).
10. Let tubes stand at room temperature for 20 minutes (hypotonic treatment).
11. Centrifuge tubes for 8 minutes at 1200 rpm (300 x g).
12. Aspirate supernatant leaving about 1.0 mL of hypotonic solution above cell pellet.

NOTE: Be cautious of fibrous material that may extend from the cell pellet up into the supernatant after centrifugation. The last few mL of supernatant may need to be removed by hand with a Pasteur pipette (not using vacuum aspiration) to avoid aspirating the entire cell pellet into the waste container.

13. Resuspend cell pellet as described in step 8.
14. VERY SLOWLY add 10 mL of freshly prepared modified Carnoy's fixative (3 parts absolute methanol: 1 part glacial acetic acid) to each tube while vortexing (on the lowest setting).
15. Let tubes stand at room temperature for 20 minutes (first fix).
16. Repeat steps 11 - 13.
17. Add 5 mL of fixative as in step 14.
18. Let tubes stand at room temperature for 10 minutes (second fix).
19. Repeat steps 16-18 (third fix).
20. At this point, fixed cell pellets can be used immediately for slide preparation according to the laboratory's standard protocol or stored in the refrigerator (2-8°C) for future use.

#### STORAGE AND STABILITY

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

#### PRECAUTIONS AND WARNINGS

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

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

**INDIKATIONEN**

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

**PRODUKTBESCHREIBUNG**

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

**INHALTSSTOFFE**

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

**QUALITÄTSSICHERUNG**

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

**ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND HILFSSTOFFE (NICHT IM LIEFERUMFANG)**

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

**VORBEREITUNG**

Das CHANG Marrow 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.

**GEBRAUCHSANWEISUNG**

Probenvorbereitung:

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

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

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

**Knochenmarkkultur:**

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow
2. Die Flasche vor der Beimpfung auf 37 °C äquilibrieren.
3. Mit einem Hämozytometer eine Leukozytenzählung (LEU) der Probe durchführen. Jede Kultur mit einer geeigneten Probenmenge beimpfen, um eine optimale Konzentration von 1 X 10<sup>6</sup> Zellen/ml oder 10 X 10<sup>6</sup> Zellen pro 10 ml Kultur zu erhalten.
4. Jedes Labor ist selbst für die Bestimmung der Anzahl der vorzubereitenden Kulturen in Abhängigkeit von der klinischen Indikation des Patienten zuständig. Bei Bedarf können zusätzliche Wachstumsfaktoren hinzugefügt werden. Alle Flaschen bis zur Entnahme in einen 37 °C warmen Inkubator stellen.

**Kulturgewinnung:**

1. Die Kulturflaschen aus dem Inkubator nehmen und leicht schwenken, um die Zellen zu resuspendieren.
2. Den Inhalt aus jeder Flasche in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen.
3. In jedes Röhrchen 100 µl Colcemid (10 µg/ml) geben.
4. Die Röhrchen verschließen und durch Überkopfdrehen mischen.
5. Die Röhrchen 20 Minuten bei 37 °C inkubieren.
6. Die Röhrchen im Anschluss an die Inkubation 8 Minuten bei 1.200 U/min (300 x g) zentrifugieren.
7. Überstand von jedem Röhrchen vorsichtig absaugen.
8. Das Zellpellet durch vorsichtiges Mischen oder Anschneiden des Röhrchenbodens mit dem Zeigefinger resuspendieren.
9. GANZ LANGSAM 10 ml hypotone Lösung (0,075 M Kaliumchlorid) in jedes Röhrchen geben, während der Vortexmischer (auf niedrigster Stufe) läuft.
10. Die Röhrchen 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (hypotone Behandlung).
11. Die Röhrchen 8 Minuten bei 1.200 U/min (300 x g) zentrifugieren.
12. So viel Überstand absaugen, dass etwa 1,0 ml hypotone Lösung über dem Zellpellet verbleiben.

HINWEIS: Beim Absaugen nach dem Zentrifugieren auf Fasermaterial vom Zellpellet achten, das eventuell in den Überstand hineinragen könnte. Die letzten ml Überstand sollten ggf. von Hand mit einer Pasteurpipette entfernt werden (ohne Vakuumaspiration), um zu verhindern, dass das ganze Zellpellet in den Abfallbehälter eingesaugt wird.

13. Das Zellpellet wie in Schritt 8 beschrieben resuspendieren.

14. GANZ LANGSAM 10 ml frisch zubereitetes, modifiziertes Carnoy-Fixiermittel (3 Teile absolutes Methanol: 1 Teil Eisessig) in jedes Röhrchen geben, während der Vortexmischer (auf niedrigster Stufe) läuft.

15. Die Röhrchen 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (erste Fixierung).

16. Schritte 11–13 wiederholen.

17. 5 ml Fixiermittel gemäß Schritt 14 hinzugeben.

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

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

20. An diesem Punkt können fixierte Zellpellets sofort für die Objektträgerpräparation gemäß dem Standardprotokoll des Labors verwendet oder zur späteren Verwendung im Kühlschrank (2–8 °C) aufbewahrt werden.

**LAGERUNG UND STABILITÄT**

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

**VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE**

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

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

**INDICAZIONI PER L'USO**

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

**DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO**

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

**COMPONENTI**

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

**GARANZIA DI QUALITÀ**

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

**MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI**

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

**PREPARAZIONE PER L'USO**

Scongela CHANG Marrow per una notte in frigorifero (2-8 °C) quindi agitarlo delicatamente per renderlo 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.

**ISTRUZIONI PER L'USO**

Preparazione del campione:

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

- Qualora si riceva più di 5 ml di aspirato midollare, il campione può essere emodiluito. Centrifugare il campione a 1200 giri/min per 8 minuti per isolare la frazione di midollo osseo.
- Se il campione arriva in un terreno di trasporto, centrifugarlo a 1200 giri/min per 8 minuti per farlo depositare e rimuovere il terreno di trasporto (surnatante). Inoculare usando la frazione depositata restante sul fondo della provetta.

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

**Coltura di midollo osseo**

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

1. 10,0 ml di CHANG Marrow
2. Portare la fiasca a 37 °C prima di inoculare il campione.
3. Con un emocitometro, eseguire una conta dei leucociti nel campione. Inoculare ogni coltura con la quantità di campione appropriata a raggiungere la concentrazione ottimale di 1 X 10<sup>6</sup> cellule/ml o 10 X 10<sup>6</sup> cellule per 10 ml di coltura.
4. Ogni laboratorio dovrà determinare il numero di colture da predisporre, in funzione delle indicazioni cliniche del paziente. È possibile aggiungere ulteriori fattori di crescita, se lo si ritiene necessario. Porre tutte le fiasche in incubatore a 37 °C fino alla raccolta.

**Raccolta delle colture**

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

Nota: fare attenzione al materiale fibroso che potrebbe estendersi dal pellet nel surnatante dopo la centrifugazione. Potrebbe essere necessario rimuovere gli ultimi ml di surnatante mediante una pipetta Pasteur (non usare la pompa a vuoto) per evitare di aspirare tutto il pellet nel contenitore di scarto.

13. Risospendere il pellet come descritto al punto 8.
14. Aggiungere MOLTO LENTAMENTE 10 ml di fissativo di Carnoy modificato appena preparato (3 parti di metanolo assoluto: 1 parte di acido acetico glaciale) a ogni provetta mentre questa è inserita nel miscelatore Vortex alla velocità minima.

15. Lasciare le provette a temperatura ambiente per 20 minuti (primo fissaggio).

16. Ripetere i punti da 11 a 13.

17. Aggiungere 5 ml di fissativo come descritto al punto 14.

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

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

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

**CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

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

**PRECAUZIONI E AVVERTENZE**

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

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



## INDICACIÓN DE USO

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

## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

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

## COMPONENTES

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

## GARANTÍA DE CALIDAD

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

## MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

## PREPARACIÓN PARA EL USO

El CHANG Marrow 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.

## INSTRUCCIONES DE USO

Preparación de la muestra:

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

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

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

## Cultivo de médula ósea:

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

Para cada muestra, preparar un frasco que contenga:

1. 10,0 ml de CHANG Marrow
2. Equilibrar el frasco a 37 °C antes de inocular la muestra.
3. Con un hemocitómetro, realizar un recuento leucocitario (RL) de la muestra. Inocular cada cultivo con la cantidad apropiada de muestra para lograr una concentración óptima de 1 X 10<sup>6</sup> células/ml o 10 X 10<sup>6</sup> células por cada 10 ml de cultivo.
4. Cada laboratorio determinará el número requerido de cultivos dependiendo de la indicación clínica de la paciente. Se pueden añadir otros factores de crecimiento si se desea. Colocar todos los frascos en una incubadora a 37 °C hasta que estén listos para la cosecha.

## Cosecha de los cultivos:

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

NOTA: Tenga cuidado con el material fibroso que puede extenderse desde el sedimento celular hasta el sobrenadante después de la centrifugación. Para evitar la aspiración de todo el sedimento celular en el recipiente de desecho, los últimos mililitros de sobrenadante se deben a veces aspirar a mano (sin aplicar vacío) con una pipeta Pasteur.

13. Resuspender el sedimento celular como se describe en el paso 8.

14. Con una pipeta Pasteur, añadir MUY LENTAMENTE 10 ml de fijador de Carnoy modificado recién preparado (3 partes de metanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) a cada tubo mientras se agita en el vórtex (con el ajuste más bajo).

15. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 20 minutos (primera fijación).
16. Repetir los pasos 11-13.
17. Añadir 5 ml de fijador como en el paso 14.
18. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos (segunda fijación).
19. Repetir los pasos 16-18 (tercera fijación).
20. En este momento, las esferas celulares fijadas se pueden utilizar de inmediato para preparar los portaobjetos según el protocolo estándar del laboratorio o conservar en el frigorífico (2-8 °C) para su uso futuro.

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

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

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

**INDICATION D'UTILISATION**

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

**DESCRIPTION DU DISPOSITIF**

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

**COMPOSANTS**

|  |                        |                                    |
|--|------------------------|------------------------------------|
| <u>Acides aminés</u>                                 | <u>Sels et ions</u>    | <u>Autre</u>                       |
| Alanine  | Chlorure de sodium     | Biotine                            |
| Arginine   | Sélénite de sodium     | Milieu conditionné de tumeur       |
| Asparagine   | Chlorure de calcium    | à cellules géantes (TCG)           |
| Acide aspartique                                     | Chlorure de choline    |                                    |
| Cystine  | Chlorure de potassium  | <u>Vitamines et oligo-éléments</u> |
| Acide glutamique                                     | Nitrate de potassium   | Acide folique                      |
| Glutamine  | Glycine                | Nicotinamide                       |
| Glycine  | Histidine              | Riboflavine                        |
| Histidine  | Isoleucine             | Thiamine                           |
| Isoleucine   | Leucine                | Acide                              |
| Leucine  | Lysine                 | acide pantothénique                |
| Lysine   | Méthionine             | Cobalamine                         |
| Méthionine   | Phénylalanine          | Pyridoxine                         |
| Phénylalanine  | Proline                |                                    |
| Proline  | Sérine                 | <u>Eau</u>                         |
| Sérine   | Thréonine              | Qualité WFI                        |
| Thréonine  | Tryptophane            |                                    |
| Tryptophane  | Tyrosine               | <u>Substrats énergétiques</u>      |
| Tyrosine   | Valine                 | Glucose                            |
| Valine   |                        | Pyruvate                           |
| <u>Protéines, hormones et facteurs de croissance</u> |                        | Inositol                           |
| Sérum de veau foetal (SVF)                           | <u>Antibiotique</u>    |                                    |
| hrGM-CSF   | Sulfate de gentamicine |                                    |

**ASSURANCE QUALITÉ**

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

**MATÉRIAUX ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS**

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

**PRÉPARATION**

CHANG Marrow 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.

**MODE D'EMPLOI**

Préparation des échantillons :

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

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

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

**Culture de moelle osseuse :**

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

1. 10,0 ml de CHANG Marrow
2. Équilibrer le flacon à 37 °C avant l'inoculation de l'échantillon.
3. À l'aide d'un hémocytomètre, effectuer la numération leucocytaire de l'échantillon. Inoculer chaque culture avec la quantité appropriée d'échantillon pour obtenir une concentration optimale de 1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml ou 10 x 10<sup>6</sup> cellules par 10 ml de culture.
4. Chaque laboratoire doit déterminer le nombre de cultures à préparer en fonction de l'indication clinique du patient. D'autres facteurs de croissance peuvent également être ajoutés, le cas échéant. Placer tous les flacons dans une étuve à 37 °C jusqu'à ce qu'ils soient prêts pour la collecte.

**Collecte des cultures :**

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

14. Ajouter TRÈS LENTEMENT 10 ml de solution de fixation de Carnoy modifiée fraîchement préparée (3 parts de méthanol absolu/1 part d'acide acétique glacial) à chaque tube tout en le mélangeant au vortex (réglage le plus faible).
15. Laisser les tubes à température ambiante pendant 20 minutes (première fixation).
16. Répéter les étapes 11 à 13.
17. Ajouter 5 ml de solution de fixation, conformément à l'étape 14.
18. Laisser les tubes à température ambiante pendant 10 minutes (deuxième fixation).
19. Répéter les étapes 16 à 18 (troisième fixation).
20. À ce stade, les culots de cellules fixées peuvent être utilisés immédiatement pour la préparation des lames, conformément au protocole standard du laboratoire, ou conservés au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) pour utilisation ultérieure.

**CONSERVATION ET STABILITÉ**

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

**PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE**

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

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

## PORTUGUÊS

### INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO

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

### DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

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

### COMPONENTES

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

### GARANTIA DE QUALIDADE

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

### MATERIAIS E EQUIPAMENTO

#### NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

### PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

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

### INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparação da amostra:

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

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

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

### Cultura de medula óssea:

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

1. 10,0 ml de CHANG Marrow
2. Antes da inoculação do espécime, deixe o frasco de cultura atingir os 37 °C.
3. Utilizando um hemocítmetro, efetue uma contagem dos glóbulos brancos da amostra. Inocule cada cultura com a quantidade adequada de amostra para obter uma concentração ideal de 1 X 10<sup>6</sup> células/ml ou 10 X 10<sup>6</sup> células por 10 ml de cultura.
4. Cada laboratório deve determinar o número de culturas a preparar dependendo da indicação clínica do doente. Se pretender, pode adicionar mais fatores de crescimento. Coloque todos os frascos de cultura numa incubadora a 37 °C até estar pronto para a colheita.

### Colheita de culturas:

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

NOTA: Tenha atenção ao material fibroso que pode estender-se a partir do *pellet* de células para cima, para o interior do sobrenadante após a centrifugação. Os últimos mililitros de sobrenadante podem ter de ser removidos à mão com uma pipeta de Pasteur (não utilizar aspiração com vácuo) para evitar aspirar todo o *pellet* de células para o recipiente de resíduos.

13. Ressuspenda o *pellet* de células tal como descrito no passo 8.
14. Adicione MUITO LENTAMENTE 10 ml de fixador de Carnoy modificado recém-preparado (3 partes de metanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) a cada tubo enquanto mistura no misturador de vórtice (na definição mais baixa).
15. Deixe os tubos repousarem à temperatura ambiente durante 20 minutos (primeira fixação).
16. Repita os passos 11 a 13.
17. Adicione 5 ml de fixador, tal como no passo 14.
18. Deixe os tubos repousarem à temperatura ambiente durante 10 minutos (segunda fixação).
19. Repita os passos 16 a 18 (terceira fixação).
20. Neste ponto, os *pellets* de células fixadas podem ser utilizados imediatamente para a preparação de lâminas de acordo com o protocolo padrão do laboratório ou conservados no frigorífico (2 °C–8 °C) para utilização futura.

### CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

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

### PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

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

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



**ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ**

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

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ**

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

**ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ**

|                 |                                |  |
|-----------------|--------------------------------|--|
| <b>Αμινοξέα</b> | <b>Πρωτεΐνες</b>               | <b>Ενεργειακά υποστρώματα</b>                |
| Αλανίνη         | <u>ορμόνες και</u>             | Γλυκόζη                                      |
| Αργινίνη        | <u>αυξητικοί</u>               | Πυροσαφουλικό                                |
| Ασπαράγιν       | <u>παράγοντες</u>              | Ινοσιτόλη                                    |
| Ασπार्टικό οξύ  | Ορός από έμβryo βοοειδών (FBS) | <b>Αντιβιοτικό</b>                           |
| Κυστίνη         | hrGM-CSF                       | Θειική γενταμικίνη                           |
| Γλουταμικό οξύ  |                                |  |
| Γλουταμίνη      | <b>Άλατα και ιόντα</b>         |  |
| Γλυκίνη         | Χλωριούχο νάτριο               | <b>Άλλα</b>                                  |
| Ιστιδίνη        | Σεληνικό νάτριο                | Βιοτίνη                                      |
| Ισολευκίνη      | Χλωριούχο ασβέστιο             | Giant cell tumor conditioned medium (GCT-CM) |
| Λευκίνη         | Χλωριούχος χολίνη              | <b>Βιταμίνες και</b>                         |
| Λυσίνη          | Χλωριούχο κάλιο                | <b>ιχνοστοιχεία</b>                          |
| Μεθειονίνη      | Νιτρικό κάλιο                  | Φυλλικό οξύ                                  |
| Φαινυλαλανίνη   | Θειικό μαγνήσιο                | Νικοτινική                                   |
| Προλίνη         | Φωσφορικό νάτριο               | Ριβοφλαβίνη                                  |
| Σερίνη          |                                | Θειαμίνη                                     |
| Θρεονίνη        | <b>Ρυθμιστικά</b>              | Πανθοθενικό οξύ                              |
| Τρυπτοφάνη      | <b>διαλύματα</b>               | Κοβαλαμίνη                                   |
| Τυροσίνη        | Διπανθρακικό νάτριο            | Πυριδοξίνη                                   |
| Βαλίνη          | HEPES                          | <b>Νερό</b>                                  |
|                 |                                | Ποιότητα ενέσιμου ύδατος (WFI)               |

**ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

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

**ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ**

1. Πλαστικά, αποστειρωμένα σωληνάρια φυγόκεντρον και μπουκαλάκια καλλιέργειας
2. Επώασθρας CO<sub>2</sub> στους 37°C
3. Επιτραπέζια φυγόκεντρον
4. Αναμίκτης στροβιλισμού
5. Αποθεματικό διάλυμα κολοσιμίδης, 10 μg/mL
6. Διάλυμα χλωριούχου καλίου, 0,075 M
7. Διάλυμα μονιμοποίησης, μεθανόλη:οξικό οξύ (3:1)

**ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ**

Το CHANG Marrow θα πρέπει να αποψύχεται κατά τη διάρκεια της νύχτας στο ψυγείο (2-8 °C) και στη συνέχεια να αναμιγνύεται ήπια, ώστε να διασφαλίζεται η ομογένειά του. Διανείμετε με άσηπτες συνθήκες 10 mL μέσου σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια καλλιέργειας και ισορροπήστε στους 37 °C για άμεση χρήση σε καλλιέργειες μυελού των οστών.

**ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ**

Προετοιμασία δειγμάτων:

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

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

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

**Καλλιέργεια μυελού των οστών:**

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

1. 10,0 mL CHANG Marrow
2. Εξορροπήστε το μπουκαλάκι στους 37 °C πριν από τον ενοφθαλισμό του δείγματος.
3. Χρησιμοποιώντας αιμοκυτταρομέτρο, πραγματοποιήστε μέτρηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) του δείγματος. Ενοφθαλίστε κάθε καλλιέργεια με την κατάλληλη ποσότητα δείγματος, για να επιτύχετε τη βέλτιστη συγκέντρωση 1 X 10<sup>6</sup> κυττάρων/mL ή 10 X 10<sup>6</sup> κυττάρων ανά 10 mL καλλιέργειας.
4. Κάθε μεμονωμένο εργαστήριο θα πρέπει να προσδιορίσει τον αριθμό των καλλιιεργειών που θα παρασκευάσει, ανάλογα με την κλινική ένδειξη του ασθενούς. Μπορείτε να προσθέσετε πρόσθετους αυξητικούς παράγοντες αν το επιθυμείτε. Τοποθετήστε όλα τα μπουκαλάκια σε επώασθρα στους 37 °C, μέχρι να είναι έτοιμα για συλλογή.

**Συλλογή καλλιιεργειών:**

1. Αφαιρέστε τις καλλιέργειες από τον επώασθρα και περιδινίστε με ήπιες κινήσεις για την επανεναιώρηση των κυττάρων.
2. Μεταφέρετε το περιεχόμενο που έχει κάθε μπουκαλάκι σε σωληνάριο φυγόκεντρον των 15 mL.
3. Προσθέστε 100 μL αποθεματικού διαλύματος κολοσιμίδης (10 μg/mL) σε κάθε σωληνάριο.
4. Πωματίστε τα σωληνάρια και αναμείξτε με αναστροφή.
5. Επώαστε τα σωληνάρια στους 37 °C για 20 λεπτά.
6. Μετά την επώαση, φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.200 σ.α.λ. (300 x g).
7. Αναρροφήστε προσεκτικά το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο.
8. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος αναμειγνύοντας με ήπιες κινήσεις ή τινάζοντας το κάτω μέρος του σωληναρίου με τον δείκτη του χεριού.

9. Προσθέστε POLY AFGA 10 mL υποτονικού διαλύματος (0,075 M χλωριούχου καλίου) σε κάθε σωληνάριο ενόσω αναδεύετε με αναμίκτη στροβιλισμού (στη χαμηλότερη ρύθμιση).
10. Αφήστε τα σωληνάρια να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά (επεξεργασία με υποτονικό διάλυμα).
11. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια για 8 λεπτά στις 1.200 σ.α.λ. (300 x g).
12. Αναρροφήστε το υπερκείμενο αφήνοντας περίπου 1,0 mL υποτονικού διαλύματος πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα.  
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Προσέχετε το ινώδες υλικό που μπορεί να επεκταθεί από το κυτταρικό συσσωμάτωμα προς τα πάνω και μέσα στο υπερκείμενο υγρό μετά τη φυγοκέντρωση. Τα τελευταία λίγα mL του υπερκείμενου υγρού μπορεί να πρέπει να αφαιρεθούν χειρωνακτικά με πιπέτα Παστέρ (χωρίς να χρησιμοποιηθεί αναρρόφηση κενού) για να αποφευχθεί η αναρρόφηση ολόκληρου του κυτταρικού συσσωματώματος στον κάδο απορριμμάτων.
13. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος, όπως περιγράφεται στο βήμα 8.
14. Προσθέστε POLY AFGA 10 mL πρόσφατα παρασκευασμένου, τροποποιημένου μέσου μονιμοποίησης Carnoy (3 μέρη απόλυτης μεθανόλης: 1 μέρος παγόμορφου οξικού οξέος) σε κάθε σωληνάριο, ενόσω αναδεύετε με αναμίκτη στροβιλισμού (στη χαμηλότερη ρύθμιση).
15. Αφήστε τα σωληνάρια να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά (πρώτη μονιμοποίηση).
16. Επαναλάβετε τα βήματα 11-13.
17. Προσθέστε 5 mL διαλύματος μονιμοποίησης, όπως στο βήμα 14.
18. Αφήστε τα σωληνάρια να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά (δεύτερη μονιμοποίηση).
19. Επαναλάβετε τα βήματα 16-18 (τρίτη μονιμοποίηση).
20. Σε αυτό το σημείο, τα μονιμοποιημένα κυτταρικά συσσωματώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για την προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών, σύμφωνα με το τυπικό πρωτόκολλο του εργαστηρίου ή να φυλαχθούν στο ψυγείο (2-8 °C) για μελλοντική χρήση.

**ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**

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

**ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ**

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

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

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

## POPIS PROSTŘEDKU

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

## SLOŽKY

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

## ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

Dosažené výsledky může ovlivnit několik faktorů včetně zdroje vzorků, 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. Účinnost každé šarže média CHANG Marrow byla otestována na klinických kulturách kostní dřeně nezávislou klinickou cytogenetickou laboratoří v porovnání s kontrolním médiem. Výsledky jsou uvedeny v analytickém certifikátu k příslušné šarži.

## POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENÍ

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

## PŘÍPRAVA K POUŽITÍ

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

## NÁVOD K POUŽITÍ

Příprava vzorku:

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

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

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

## Kultivace kostní dřeně:

Všechny kultivační nádoby označte jménem pacientky, číslem vzorku a typem kultury. Pro každou kulturu připravte kultivační lahev obsahující:

1. 10,0 ml CHANG Marrow.
2. Před inokulací vzorku lahev ekvilibrujte na 37 °C.
3. Hemocytometrem stanovte počet leukocytů ve vzorku. Inokulujte každou kulturu příslušným objemem vzorku tak, aby bylo dosaženo optimální koncentrace 1 × 10<sup>6</sup> buněk/ml neboli 10 × 10<sup>6</sup> buněk na 10 ml kulturu.
4. Každá laboratoř si podle klinické indikace pacientky stanoví počet kultur, které je třeba připravit. Podle potřeby lze přidat další růstové faktory. Vložte všechny kultivační lahve do inkubátoru o teplotě 37 °C, dokud nebudou připraveny ke sběru.

## Sběr kultur:

1. Vyjměte kultury z inkubátoru a jemným zakroužením resuspendujte buňky.
2. Přeneste obsah každé kultivační lahve do 15 ml centrifugační zkumavky.
3. Do každé zkumavky přidejte 100 µl zásobního roztoku Colcemid (10 µg/ml).
4. Zazátkujte zkumavky a promíchejte převrácením.
5. Zkumavky inkubujte 20 minut při teplotě 37 °C.
6. Po inkubaci zkumavky odstředěte po dobu 8 minut na 1 200 ot./min. (300 × g).
7. Opatrně z každé zkumavky aspirujte supernatant.
8. Resuspendujte buněčný pelet jemným promícháním nebo cvrnkáním ukazovákem na dno zkumavky.
9. VELMI POMALU přidejte 10 ml hypotonického roztoku (chlorid draselný 0,075 M) do každé zkumavky při vortexování (na nejvyšší rychlost).
10. Nechte zkumavky 20 minut odstát při pokojové teplotě (hypotonizace).
11. Odstředěte zkumavky po dobu 8 minut na 1 200 ot./min. (300 × g).
12. Aspirujte supernatant; ponechte přibližně 1,0 ml hypotonického roztoku na buněčným peletem.

POZNÁMKA: Věnujte pozornost vláknitému materiálu, který po centrifugaci může z peletu zasahovat do supernatantu. Posledních několik ml supernatantu může být nutné odstranit ručně Pasteurovou pipetou (nikoli podtlakovou aspirací), abyste zabránili nasátí celého buněčného peletu do odpadní nádoby.

13. Resuspendujte buněčný pelet podle popisu v kroku 8.
14. Za neustálého míchání na třepačce vortex (na nejvyšší rychlost) přidejte do každé zkumavky VELMI POMALU 10 ml čerstvě připraveného modifikovaného Carnoyova fixačního roztoku (3 díly absolutního methanolu : 1 díl kyseliny octové ledové).

15. Nechte zkumavky 20 minut odstát při pokojové teplotě (první fixace).

16. Opakujte kroky 11–13.

17. Přidejte 5 ml fixačního roztoku jako v kroku 14.

18. Nechte zkumavky 10 minut odstát při pokojové teplotě (druhá fixace).

19. Opakujte kroky 16–18 (třetí fixace).

20. V této chvíli lze fixované buněčné pelety ihned použít k přípravě sklíček podle standardního protokolu laboratoře nebo uložit do chladničky (2–8 °C) k budoucímu použití.

## UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

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

## BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

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

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



**INDIKATIONER FOR ANVENDELSE**

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

**BESKRIVELSE AF PRODUKTET**

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

**KOMPONENTER**

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

**KVALITETSSIKRING**

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

**NØDVENDIGE MATERIALER OG Udstyr, DER IKKE MEDFØLGER**

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

**KLARGØRING**

CHANG Marrow 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.

**BRUGSANVISNING**

Prøveforberedelse:

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

- Hvis der modtages mere end 5 ml knoglemarvaspirat, kan prøven være en hæmodilution. Centrifuger prøven ned ved 1200 o/min. i 8 minutter for at isolere knoglemarvsfraktionen.
- Hvis prøven ankommer i transportmedium, centrifugeres prøven ned ved 1200 o/min. i 8 minutter, og transportmediet (supernatant) fjernes. Indpod resten af den nedcentrifugerede fraktion i bunden af røret.

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

**Knoglemarvskultur:**

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow
2. Ækvilibrer kolben til 37 °C, inden prøven indpodes.
3. Foretag en leukocytælling af prøven med et hæmocytometer. Indpod hver dyrkning med en passende mængde prøve for at opnå en optimal koncentration af 1 X 10<sup>6</sup> celler/ml eller 10 X 10<sup>6</sup> celler pr. 10 ml kultur.
4. Hvert enkelt laboratorium bestemmer antallet af dyrkninger, der skal opsættes, afhængigt af patientens kliniske indikation. Der kan eventuelt tilsættes ekstra vækstfaktorer. Anbring alle kolber i en 37 °C inkubator, indtil de er klar til høst.

**Høst af kulturerne:**

1. Tag kulturerne ud af inkubatoren, og hvirvl dem forsigtigt rundt for at resuspendere cellerne.
2. Overfør indholdet af hver kolbe til et 15 ml centrifugerør.
3. Tilsæt 100 µl Colcemid-stamopløsning (10 µg/ml) til hvert rør.
4. Sæt hætter på rørene, og bland dem ved at vende dem op og ned.
5. Inkuber rørene ved 37 °C i 20 minutter.
6. Efter inkubation centrifugeres rørene i 8 minutter ved 1200 o/min. (300 x g).
7. Aspirer forsigtigt supernatanten ud af hvert rør.
8. Resuspender cellepelleten ved forsigtig blanding eller ved at banke let på bunden af røret med pegefingern.
9. Tilsæt MEGET LANGSOMT 10 ml hypotonisk opløsning (0,075 M kaliumklorid) til hvert rør, mens der vortexblandes (på laveste indstilling).
10. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 20 minutter (hypotonisk behandling).
11. Centrifuger rørene i 8 minutter ved 1200 o/min. (300 x g).
12. Aspirer supernatanten, og efterlad ca. 1,0 ml hypotonisk opløsning over cellepelleten.

BEMÆRK: Udvis forsigtighed mht. fibrøst materiale, der kan strække sig fra cellepelleten og op ind i supernatanten efter centrifugering. De sidste par ml supernatant skal muligvis fjernes med hånden med en Pasteurpipette (ikke med vakuumaspiration) for at undgå at aspirere hele cellepelleten ind i affaldsbeholderen.

13. Resuspender cellepelleten, som beskrevet i trin 8.
14. Tilsæt MEGET LANGSOMT 10 ml frisk klargjort modifieret Carnoys fiksering (3 dele absolut methanol: 1 del iseddikesyre) til hvert rør, mens der vortexblandes (på laveste indstilling).
15. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 20 minutter (første fiksering).
16. Gentag trin 11-13.
17. Tilsæt 5 ml fiksering som i trin 14.
18. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 10 minutter (anden fiksering).
19. Gentag trin 16-18 (tredje fiksering).
20. På dette tidspunkt kan de fikserede cellepellets straks anvendes til forberedelse af objektglas ifølge laboratoriets standardprotokol eller opbevares i køleskab (2-8 °C) til senere anvendelse.

**OPBEVARING OG STABILITET**

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

**FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER**

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

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

**KÄYTTÖAIHE**

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

**VÄLINEEN KUVAUS**

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

**AINESOSAT**

| <u>Aminohapot</u> | <u>Proteiinit, hormonit ja kasvutekijät</u> | <u>Antibiootti</u>                                    |
|-------------------|---|---|
| alaniini          | naudan sikiön seerumi (FBS)                 | gentamysiinisulfaatti                                 |
| arginiini         | hrGM-CSF                                    |   |
| asparagiini       |   | <u>Muut</u>   |
| asparagiinihappo  |   | biotiini  |
| kystiini          |   | osteoklastoomasoluviljelmässä käytetty liuos (GCT-CM) |
| glutaminihappo    | <u>Suolat ja ionit</u>                      |   |
| glutamiini        | natriumkloridi                              |   |
| glysiini          | natriumseleniitti                           |   |
| histidiini        | kalsiumkloridi                              | <u>Vitamiinit ja hivenaineet</u>                      |
| isoleusiini       | koliinikloridi                              | foolihappo  |
| leusiini          | kaliumpkloridi                              | nikotiiniamidi  |
| lysiini           | kaliumnitraatti                             | riboflaviini  |
| metioniini        | magnesiumsulfaatti                          | tiamiini  |
| fenyylialaniini   | natriumfosfaatti                            | pantoteenihihappo                                     |
| proliini          |   | kobalamiini   |
| seriini           | <u>Puskurit</u>                             | pyridoksiini  |
| treoniini         | natriumbikarbonaatti                        |   |
| tryptofaani       | HEPES                                       | <u>Vesi</u>   |
| tyrosiini         |   | injektioesteisiin tarkoitettun veden laatuinen        |
| valiini           | <u>Energiasubstraatit</u>                   |   |
|                   | glukoosi                                    |   |
|                   | pyruvaatti                                  |   |
|                   | inositoli                                   |   |

**LAADUNVARMENNUS**

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

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

- Muovisia steriilejä sentrifugiputkia ja viljelypulloja
- CO<sub>2</sub>-lämpökaappi, 37 °C
- Pöytäsentrifugi
- Vortex-sekoitin
- Colsemid-kantaliuos, 10 µg/ml
- Kaliumpkloridiliuos, 0,075 M
- Fiksatiiviliuos, metanoli:etikkahappo (3:1)

**KÄYTÖN VALMISTELU**

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

**KÄYTTÖOHJEET**

Näytteen valmistelu:

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

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

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

**Luuytimen viljely:**

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

- 10,0 ml CHANG Marrow -liuosta.
- Tasapainota pullo 37 °C:seen ennen näytteen siirrostamista.
- Laske näytteen valkosolumäärä (WBC) hemosytometrillä. Siirrosta kuhunkin viljelmään sopiva määrä näytettä, jotta saadaan optimaalinen pitoisuus 1 X 10<sup>6</sup> solua/ml eli 10 X 10<sup>6</sup> solua 10 ml:n viljelmää kohti.
- Jokaisen yksittäisen laboratorion on määritettävä aloitettavien viljelmien määrä potilaan kliinisen indikaation mukaisesti. Haluttaessa voidaan lisätä muita kasvutekijöitä. Aseta kaikki pullo 37 °C:n lämpökaappiin, kunnes solut ovat valmiita keräykseen.

**Viljelmien kerääminen:**

- Ota viljelmat lämpökaapista ja uudelleensuspendoi solut varovasti pyörittämällä.
- Siirrä kunkin pullon sisältö 15 ml:n sentrifugiputkeen.
- Lisää 100 µl Colcemid-kantaliuosta (10 µg/ml) jokaiseen putkeen.
- Sulje putket korkilla ja sekoita kääntelemällä.
- Inkuboi putkia 37 °C:ssa 20 minuutin ajan.
- Sentrifugoi putkia inkuboinnin jälkeen 8 minuuttia nopeudella 1 200 rpm (300 x g).
- Aspiroi varovasti supernatantti kustakin putkesta.
- Uudelleensuspendoi solupelletti varovasti sekoittamalla tai napsauttamalla putken pohjaa etusormella.
- Lisää HYVIN HITAASTI 10 ml hypotonista liuosta (0,075 M kaliumpkloridia) kuhunkin putkeen, samalla kun sekoitat Vortexilla (pienin asetus).
- Anna putkien olla paikallaan huoneenlämmössä 20 minuuttia (hypotoninen käsittely).
- Sentrifugoi putkia 8 minuuttia nopeudella 1 200 rpm (300 x g).
- Aspiroi supernatantti jättäen noin 1,0 ml hypotonista liuosta solupelletin yläpuolelle.

HUOMAUTUS: Varo säikeistä materiaalia, joka voi ulottua solupelletistä ylös supernatanttiin sentrifugoinnin jälkeen. Supernatantin viimeiset muutamat millilitrat on ehkä poistettava käsin pasteuripipetillä (ei imuaspiraatiolla), jotta koko solupelletin imeminen jättestiaan vältetään.

- Uudelleensuspendoi solupelletti vaiheessa 8 kuvatulla tavalla.
- Lisää HYVIN HITAASTI 10 ml juuri valmistettua muunneltua Carnoy-fiksatiivia (3 osaa absoluuttista metanolia : 1 osa jäätikkää) kuhunkin putkeen samalla sekoittaen Vortexilla (pienin asetus).
- Anna putkien olla paikallaan huoneenlämmössä 20 minuuttia (ensimmäinen fiksaus).
- Toista vaiheet 11–13.
- Lisää 5 ml fiksatiivia kuten vaiheessa 14.
- Anna putkien olla paikallaan huoneenlämmössä 10 minuuttia (toinen fiksaus).
- Toista vaiheet 16–18 (kolmas fiksaus).
- Fiksattuja solupellettejä voidaan tässä vaiheessa käyttää heti näytelasin valmistamiseen laboratorion vakiomenettelyllä tai säilyttää jääkaapissa (2–8 °C) myöhempää käyttöä varten.

**SÄILYTTÄMINEN JA STABIILIUUS**

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

**VAROTOIMET JA VAROITUKSET**

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

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

## LATVISKI

### LIETOŠANAS INDIKĀCIJA

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

### IERĪCES APRĀKSTS

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

### SASTĀVDAĻAS

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

### KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

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

### NEPIECIEŠAMIE, BET NEIETVERTIE MATERIĀLI

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

### SAGATAVOŠANA LIETOŠANAI

Vakarā pirms lietošanas „CHANG Marrow” jāatstāj ledusskapī (2–8 °C) atkausēšanai, tad uzmanīgi jāsamaisa, lai nodrošinātu viendabīgumu. Aseptiski dozējiet 10 ml barotnes sterilos kultūras flakonos un nostabilizējiet 37 °C temperatūrā tūlītējai izmantošanai kaulu smadzeņu kultūrās.

### LIETOŠANAS PAMĀCĪBA

Parauga sagatavošana:

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

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

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

### Kaulu smadzeņu kultūra

Marķējiet visus kultūras traukus ar pacienta vārdu, uzvārdu, parauga numuru un kultūras veidu. Katrai kultūrai sagatavojiet flakonu, kas satur:

1. 10,0 ml „CHANG Marrow”.
2. Pirms parauga inokulācijas stabilizējiet flakonu 37 °C temperatūrā.
3. Izmantojot hemocitometru, nosakiet parauga balto asinsķermenīšu (*white blood cell – WBC*) skaitu. Inokulējiet katru kultūru ar atbilstošu parauga daudzumu, lai sasniegtu optimālo koncentrāciju 1 x 10<sup>6</sup> šūnas/ml vai 10 x 10<sup>6</sup> šūnas 10 ml kultūrai.
4. Katrai laboratorijai jānosaka sagatavojamo kultūru skaits atkarībā no pacienta klīniskās indikācijas. Ja nepieciešams, var pievienot arī papildu augšanas faktorus. Ievietojiet visus flakonus 37 °C inkubatorā, līdz tie ir gatavi ievākšanai.

### Kultivētā materiāla ievākšana

1. Izņemiet kultūras no inkubatora un uzmanīgi pavirpiniet to, lai atkārtoti suspendētu šūnas.
2. Pārsniet katru flakona saturu uz 15 ml centrifūgas stobriņu.
3. Katra stobriņa saturam pievienojiet 100 µl standartšķīduma „Colcemid” (10 µg/ml).
4. Uzlieciet stobriņu aizbāžņus un samaisiet, apvēršot otrādi.
5. Inkubējiet stobriņus 37 °C temperatūrā 20 minūtes.
6. Pēc inkubācijas centrifugējiet stobriņus 8 minūtes ar ātrumu 1200 apgr./min (paātrinājums 300 x g).
7. rūpīgi aspirējiet katru stobriņa supernatantu.
8. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, uzmanīgi maisot vai viegli piesitot stobriņa apakšdaļai ar rādītājpirkstu.
9. Kamēr stobriņi atrodas virpuļmaisītājā (lēnākajā iestatījumā), ĻOTI LĒNI pievienojiet katram stobriņam 10 ml hipotoniskā šķīduma (0,075 M nātrija hlorīda).
10. Atstājiet stobriņus istabas temperatūrā 20 minūtes (hipotoniska apstrāde).
11. Centrifugējiet stobriņus 8 minūtes ar ātrumu 1200 apgr./min (paātrinājums 300 x g).
12. Aspirējiet supernatantu, atstājot aptuveni 1,0 ml hipotoniskā šķīduma virs šūnu lodītes.

PIEZĪME: uzmanieties, rīkojoties ar šķiedrainu materiālu, kas pēc centrifugēšanas no šūnu lodītes var iesepties supernatantā. Pēdējos supernatanta ml var būt nepieciešams atdalīt manuāli ar Pastēra pipeti (nelietojot vakuuma aspirāciju), lai nepieļautu visas šūnu lodītes aspirēšanu atkritumu konteinerā.

13. Atkārtoti suspendējiet šūnu lodīti, kā aprakstīts 8. darbībā.

14. ĻOTI LĒNĀM pievienojiet 10 ml tikko sagatavota, modificēta „Carnoy” fiksācijas šķīduma (3 daļas absolūtā metilspirta: 1 daļa ledus etiķskābes) katram stobriņam, pastāvīgi maisot virpuļmaisītājā (lēnākajā iestatījumā).

15. Atstājiet stobriņus istabas temperatūrā 20 minūtes (pirmā fiksācija).
16. Atkārtojiet 11.–13. darbību.
17. Pievienojiet 5 ml fiksācijas šķīduma, kā minēts 14. darbībā.
18. Atstājiet stobriņus istabas temperatūrā 10 minūtes (otrā fiksācija).
19. Atkārtojiet 16.–18. darbību (trešā fiksācija).
20. Šobrīd fiksētās šūnu lodītes var lietot nekavējoties, lai saskaņā ar laboratorijas standarta protokolu sagatavotu priekšmetstiklīņus, vai glabāt ledusskapī (2–8 °C) vēlāki izmantošanai.

### GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

„CHANG Marrow” jāglabā sasaldēts zemākā temperatūrā par –10 °C, līdz tas ir gatavs lietošanai. Glabājot sasaldētā veidā, „CHANG Marrow” saglabā stabilitāti līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz pudeles etiķetes. Pēc atkausēšanas jebkādos neizlietotā produkta pārpalikumos var dozēt darbā izmantojamās devās un atkārtoti sasaldēt vēlāki izmantošanai vai cieši noslēgtus glabāt no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā līdz pat 30 dienām. Aizsargājiet no fluorescējošas gaismas.

### PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI

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

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



## INDICATIE VOOR GEBRUIK

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

## BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

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

## COMPONENTEN

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

## KWALITEITSBORGING

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

## VEREISTE MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN EN APPARATUUR

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

## VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

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

## GEBRUIKSAANWIJZING

Monsterpreparatie:

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

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

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

## Beenmergkweek:

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow.
2. Equilibreer de fles tot 37 °C voordat u het monster inoculeert.
3. Meet met een hemocytometer het aantal witte bloedcellen (WBC) van het monster. Inoculeer elke kweek met een passende hoeveelheid monster tot een optimale concentratie van 1 x 10<sup>6</sup> cellen/ml of 10 x 10<sup>6</sup> cellen per 10 ml kweek.
4. Elk laboratorium dient individueel te bepalen hoeveel kweken er moeten worden gemaakt aan de hand van de klinische indicatie van de patiënt. Aanvullende groeifactoren kunnen desgewenst worden toegevoegd. Plaats alle flessen in een incubator bij 37 °C tot ze klaar zijn om te oogsten.

## Oogsten van de kweken:

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

NB: Wees voorzichtig met vezelig materiaal dat na het centrifugeren vanuit de celpellet tot in het supernatant kan reiken. Het kan nodig zijn om de laatste paar ml supernatant handmatig met een pasteurpipet te verwijderen (zonder vacuümaspiratie) om aspiratie van de gehele celpellet in de afvalbak te voorkomen.

13. Resuspendeer de celpellet zoals beschreven in stap 8.
14. Voeg ZEER LANGZAAM 10 ml vers geprepareerde gemodificeerde Carnoy's fixatieoplossing (3 delen absolute methanol: 1 deel ijsazijnzuur) aan elk buisje toe, onder continu mengen met een vortexmenger (op de laagste stand).
15. Laat de buisjes gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur staan (eerste fixatie).
16. Herhaal stap 11 t/m 13.
17. Voeg 5 ml van de fixeeroplossing toe, zoals in stap 14.
18. Laat de buisjes gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur staan (tweede fixatie).
19. Herhaal stap 16 t/m 18 (derde fixatie).
20. Nu kunnen de gefixeerde celpellets direct worden gebruikt voor het prepareren van het objectglasje volgens het standaardprotocol van het laboratorium of in de koelkast (bij 2-8 °C) worden bewaard voor toekomstig gebruik.

## BEWAREN EN STABILITEIT

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

## VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

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

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

**PRZEZNACZENIE**

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

**OPIS WYROBU**

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

**SKŁADNIKI**

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

**ZAPEWNIANIE JAKOŚCI**

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

**MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE**

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

**PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA**

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

**INSTRUKCJA UŻYCIA**

Przygotowanie próbki:

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

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

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

**Hodowla komórek szpiku kostnego:**

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

1. 10,0 ml pożywki CHANG Marrow.
2. Przed posiewem próbki zrównoważyć butelkę do temperatury 37°C.
3. Za pomocą hemocytometru określić liczbę białych krwinek (WBC) w próbce. Posiać każdą hodowlę, używając odpowiedniej ilości próbki, aby osiągnąć optymalne stężenie równe 1 X 10<sup>6</sup> komórek/ml lub 10 X 10<sup>6</sup> komórek na 10 ml hodowli.
4. Każde laboratorium powinno określić liczbę nastawianych hodowli w zależności od wskazania klinicznego pacjenta. W razie potrzeby można dodać dodatkowe czynniki wzrostu. Umieścić wszystkie butelki w inkubatorze nastawionym na temperaturę 37°C i inkubować, aż hodowle będą gotowe do zbioru.

**Zbiór hodowli:**

1. Wyciągnąć hodowle z inkubatora i delikatnie obracać butelkę ruchem wirowym, aby zawiesić komórki.
2. Przenieść zawartość każdej butelki do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml.
3. Dodać po 100 µl roztworu podstawowego kolcemicu (10 µg/ml) do każdej probówki.
4. Zamknąć probówki i wymieszać, odwracając.
5. Inkubować probówki w temperaturze 37°C przez 20 minut.
6. Po inkubacji wirować probówki przez 8 minut przy 1200 rpm (300 x g).
7. Ostrożnie zaaspirować nadsącz z każdej probówki.
8. Zawiesić osad komórkowy, delikatnie mieszając lub ostukując dno probówki palcem wskazującym.
9. BARDZO POWOLI dodać 10 ml roztworu hipotonicznego (chlorek potasu w stężeniu 0,075 M) do każdej probówki, wytrząsając ją (przy najniższym ustawieniu wytrząsarki).
10. Pozostawić probówki na 20 minut w temperaturze pokojowej (poddawanie działaniu roztworu hipotonicznego).
11. Wirować probówki przez 8 minut przy 1200 rpm (300 x g).
12. Zaaspirować nadsącz, pozostawiając około 1,0 ml roztworu hipotonicznego nad osadem komórkowym.

UWAGA: Należy uważać na materiał włóknisty, który po odwirowaniu może wystawać z osadu komórkowego do nadsącza. Aby uniknąć zaaspirowania całego osadu komórkowego do zbiornika na odpady, może być konieczne ręczne usunięcie ostatnich kilku ml nadsącza za pomocą pipety Pasteura (nie korzystając z aspiracji próżniowej).

13. Zawiesić osad komórkowy zgodnie z opisem w kroku 8.
14. BARDZO POWOLI dodać 10 ml świeżo przygotowanego zmodyfikowanego roztworu utrwalającego Carnoy'a (3 części metanolu absolutnego: 1 część lodowatego kwasu octowego) do każdej probówki, wytrząsając ją (przy najniższym ustawieniu wytrząsarki).
15. Pozostawić probówki na 20 minut w temperaturze pokojowej (pierwsze utrwalenie).
16. Powtórzyć kroki 11–13.
17. Dodać 5 ml roztworu utrwalającego zgodnie z opisem w kroku 14.
18. Pozostawić probówki na 10 minut w temperaturze pokojowej (drugie utrwalenie).
19. Powtórzyć kroki 16–18 (trzecie utrwalenie).
20. Na tym etapie można od razu użyć utrwalonych osadów komórkowych do przygotowania preparatów zgodnie ze standardowym protokołem laboratorium lub przechowywać osady w chłodziarce (2–8°C) do późniejszego użycia.

**PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ**

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

**ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA**

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

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

## ROMÂNĂ

### INDICAȚIE DE UTILIZARE

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

### DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

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

### COMPONENTE

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

### ASIGURAREA CALITĂȚII

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

### MATERIALE ȘI APARATURĂ NECESARE, DAR NEFURNIZATE

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

### PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

CHANG Marrow ar trebui 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.

### INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Pregătirea probei:

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

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

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

### Cultivarea de măduvei osoase:

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

1. 10,0 mL CHANG Marrow
2. Echilibrați flaconul la 37°C înainte de inocularea specimenei.
3. Folosind un hemocitometru, efectuați numărarea (WBC) din probă. Inoculați fiecare cultură cu cantitatea de probă corespunzătoare pentru a obține o concentrație optimă de 1 X 10<sup>6</sup> celule/mL sau 10 X 10<sup>6</sup> celule la 10 mL cultură.
4. Fiecare laborator individual ar trebui să stabilească numărul de culturi care trebuie realizate în funcție de indicația clinică a pacientului. Dacă se dorește, se pot adăuga factori de creștere suplimentari. Puneți toate vasele într-un incubator la 37°C până când sunt gata de recoltare.

### Recoltarea culturilor:

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

NOTĂ: Manifestați atenție la materialul fibros care este posibil să se extindă din peleta de celule în supernatant după centrifugare. Poate fi necesar să se îndepărteze ultimii câțiva mL de supernatant cu o pipetă Pasteur (fără a folosi aspirarea cu vacuum) pentru a evita aspirarea întregii pelete de celule în recipientul pentru reziduuri.

13. Resuspendați peleta de celule așa cum se descrie la pasul 8.
14. Folosind o pipetă Pasteur, adăugați FOARTE LENT între 10 mL de fixativ Carnoy modificat proaspăt preparat (3 părți metanol absolut: 1 parte acid acetic glacial) la fiecare eprubetă în timp ce se agită la în agitatorul vortex (la cea mai redusă valoare).
15. Lăsați eprubetele să stea la temperatura camerei timp de 20 de minute (primul tratament).
16. Repetați pașii 11-13.
17. Adăugați 5 mL de soluție de fixativ ca la pasul 14.
18. Lăsați eprubetele să stea la temperatura camerei timp de 10 de minute (al doilea tratament).
19. Repetați pașii 16-18 (a treia fixare).
20. În acest punct, peletele de celule fixate pot fi folosite imediat pentru pregătirea lamelor în conformitate cu protocolul standard al laboratorului sau depozitate la frigider (2-8°C) pentru utilizare viitoare.

### DEPOZITARE ȘI STABILITATE

CHANG Marrow ar trebui depozitat congelat sub -10°C până când este gata de utilizare. CHANG Marrow este stabil până la data de expirare indicată pe eticheta flaconului când este depozitat congelat. După dezghețare, orice produs neutilizat poate fi transferat în părți alicote de lucru și recongelat pentru utilizare ulterioară sau închis ermetic și depozitat la o temperatură de 2°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 întrebuintarea pentru care a fost conceput dispozitivul.

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



## SVENSKA

### INDIKATIONER

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

### PRODUKTBESKRIVNING

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

### KOMPONENTER

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

### KVALITETSSÄKRING

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

### MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

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

### BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

CHANG Marrow 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.

### BRUKSANVISNING

Provberedning:

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

- Om mer än 5 ml benmärgsaspirat erhålls kan provet vara uppblandat med blod. Centrifugera ned provet vid 1 200 rpm under 8 minuter för att isolera benmärgsfraktionen.
- Om provet anländer i transportmedium, centrifugera ned provet vid 1 200 rpm under 8 minuter och avlägsna transportmediet (supernatanten). Använd den kvarvarande nedcentrifugerade fraktionen i botten av röret för utsädd.

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

### Benmärgsodling:

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow
2. Ekvibrera flaskan till 37 °C före utsädd av provet.
3. Utför en leukocyträkning på provet med hjälp av en hemocytometer. Inokulera varje kultur med en lämplig mängd prov så att en optimal koncentration på 1 X 10<sup>6</sup> celler/ml eller 10 X 10<sup>6</sup> celler per 10 ml kultur uppnås.
4. Varje enskilt laboratorium bör fastställa antalet kulturer som ska förberedas beroende på den kliniska indikationen. Ytterligare tillväxtfaktorer kan tillsättas om så önskas. Placera samtliga flaskor i en 37 °C inkubator fram till skörd.

### Skörda kulturerna:

1. Ta ut kulturerna ur inkubatorn och snurra dem försiktigt så att cellerna resuspenderas.
2. Överför varje flaskas innehåll till ett 15 ml centrifugrör.
3. Tillsätt 100 µl Colcemid-stamlösning (10 µg/ml) till varje rör.
4. Förslut rören och blanda genom vändning.
5. Inkubera rören vid 37 °C i 20 minuter.
6. Centrifugera rören efter inkuberingen i 8 minuter vid 1 200 rpm (300 g).
7. Aspirera supernatanten försiktigt från varje rör.
8. Resuspendera cellpelleten genom att blanda försiktigt eller genom att knäppa på rörets botten med pekfingeret.
9. Tillsätt MYCKET LÅNGSAMT 10 ml hypoton lösning (0,075 M kaliumklorid) till varje rör under vortexblandning (på lägsta inställningen).
10. Låt rören stå i rumstemperatur i 20 minuter (hypoton behandling).
11. Centrifugera rören i 8 minuter vid 1 200 rpm (300 g).
12. Aspirera supernatanten men lämna kvar cirka 1,0 ml hypoton lösning ovanför cellpelleten.

ANM: Undvik fibröst material som eventuellt kan sticka upp ur cellpelleten in i supernatanten efter centrifugering. De sista få millilitrarna supernatant kan behöva avlägsnas för hand med hjälp av en Pasteurpipett (vakuumaspirera ej) så att man undviker att aspirera upp hela cellpelleten i avfallsbehållaren.

13. Resuspendera cellpelleten enligt beskrivningen i steg 8.
14. Tillsätt MYCKET LÅNGSAMT 10 ml färsk modifierad Carnoys fixeringslösning (3 delar absolut metanol : 1 del vattenfri ättiksyra) till varje rör under vortexblandning (på lägsta inställningen).
15. Låt rören stå i rumstemperatur i 20 minuter (första fixeringen).
16. Upprepa steg 11–13.
17. Tillsätt 5 ml fixeringslösning som i steg 14.
18. Låt rören stå i rumstemperatur i 10 minuter (andra fixeringen).
19. Upprepa steg 16–18 (tredje fixeringen).
20. De fixerade cellpellets kan nu antingen användas omedelbart för beredning av objektglas enligt laboratoriets standardförfarande eller förvaras i kylskåp (2–8 °C) för senare användning.

### FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

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

### FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

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

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

**NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS**

CHANG Marrow on mõeldud kasutamiseks primaarsetes kliinilistes inimese lüüdi kultuurides karütöüpimise ja muude geneetiliste, erinevate hematoloogiliste häirete testimise eesmärgil.

**SEADME KIRJELDUS**

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

**OSAD**

| <u>Aminohapped</u> | <u>Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid</u> | <u>Antibiootikum</u>                |
|--------------------|---|-------------------------------------|
| Alaniin            | Veiselootepäritolu                        | Gentamitsiinsulfaat                 |
| Arginiin           | seerum (FBS)                              | Muu                                 |
| Asparagiin         | hrGM-CSF                                  | Biotiin                             |
| Asparaginhape      |   | Hiidrakulise                        |
| Tsüstiin           |   | kasvaja põhine                      |
| Glutamiinhape      | <u>Soolad ja ioonid</u>                   | sööde (GCT-CM)                      |
| Glutamiin          | Naatriumkloriid                           |                                     |
| Glütsiin           | Naatriumseleniit                          | <u>Vitamiinid ja mikroelemendid</u> |
| Histiidiin         | Kaltsiumkloriid                           | Foolhape                            |
| Isoleutsiin        | Koliinkloriid                             | Nikotiinamiid                       |
| Leutsiin           | Kaaliumkloriid                            | Riboflaviin                         |
| Lüsiin             | Kaaliumnitraat                            | Tiamiin                             |
| Metioniin          | Magneesiumsulfaat                         | Pantoteenhape                       |
| Fenüülalaniin      | Naatriumfosfaat                           | Kobalamiin                          |
| Proliin            |   | Püridoksiin                         |
| Seriin             | <u>Puhvrid</u>                            |                                     |
| Treoniin           | Naatriumvesinik-karbonaat                 |                                     |
| Trüptofaan         | HEPES                                     | <u>Vesi</u>                         |
| Türosiin           |   | WFI kvaliteet                       |
| Valliin            | <u>Energia substraadid</u>                |                                     |
|                    | Glükoos                                   |                                     |
|                    | Püruvaat                                  |                                     |
|                    | Inositool                                 |                                     |

**KVALITEEDI TAGAMINE**

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

**VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID JA VAHENDID**

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

**ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS**

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

**KASUTUSJUHEND**

Proovi ettevalmistamine

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

- Üle 5 ml lüüdi aspiraadi puhul võib olla tegu hemodilutsiooniga. Lüüdi fraktsiooni isoleerimiseks tsentrifuugige 1200 p/min 8 minutit.
- Kui proov tuleb transportaines, siis tsentrifuugige seda 1200 p/min 8 minutit ja eemaldage transportaine (supernatant). Inokuleerige ülejäänud tsentrifuugitud fraktsioon katsuti põhjas.

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

**Lüüdi kultuur**

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow
2. Enne proovi inokuleerimist tasakaalustage pudel temperatuurile 37 °C.
3. Loendage hemotsütomeetri abil valgete vereliblede (WBC) arv proovis. Inokuleerige igat kultuuri sobiva proovikogusega, et saavutada optimaalne kontsentratsioon 1 × 10<sup>6</sup> rakku/ml või 10 × 10<sup>6</sup> rakku 10 ml kultuuris.
4. Iga labor peab määrama kultuuride arvu, lähtudes patsiendi kliinilistest näidustustest. Vajaduse korral võib lisada lisakasvufaktoreid. Pange kõik pudelid kuni kogumiseni 37 °C inkubaatorisse.

**Kultuuride kogumine**

1. Eemaldage kultuurid inkubaatorist ja segage rakkude suspendeerimiseks õrnalt.
2. Viige iga rakupudeli sisu üle 15 ml tsentrifuugikatsutisse.
3. Lisage igasse katsutisse 100 µl toodet Colcemid (10 µg/ml).
4. Korkige katsutid ja segage ringikeeramise teel.
5. Inkubeerige katsuteid temperatuuril 37 °C 20 minutit.
6. Pärast inkubeerimist tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1200 p/min (300 × g).
7. Aspireerige igast katsutist ettevaatlikult supernatant.
8. Resuspendeerige rakupellet õrnalt segades või nipsake nimetissõrmega vastu katsuti põhja.
9. Lisage igasse katsutisse VÄGA AEGLASELT 10 ml hüpotoonilist lahust (0,075 M kaaliumkloriid), samal ajal Vortex-segades (väikseimal kiirusel).
10. Laske katsutitel seista toatemperatuuril 20 minutit (hüpotooniline töötlus).
11. Tsentrifuugige katsuteid 8 minutit 1200 p/min (300 × g).
12. Aspireerige supernatant, jättes rakupelleti peale umbes 1,0 ml hüpotoonilist lahust.  
MÄRKUS. Olge ettevaatlik fibroosse materjaliga, mis võib pärast tsentrifuugimist ulatuda rakupelletist üles supernatandi sisse. Viimased paar ml supernatanti võib olla vajalik eemaldada käsitsi, kasutades Pasteuri pipetti (mitte vaakumpipettimise teel), et vältida kogu rakupelleti aspireerimist jäätmenõusse.
13. Resuspendeerige rakupelletit, nagu on kirjeldatud sammus 8.
14. Lisage igasse katsutisse VÄGA AEGLASELT 10 ml värskest valmistatud modifitseeritud Carnoy kinnitit (3 osa absoluutmetanooli: 1 osa jää-äädikhapet), ise samal ajal Vortex-segades (väikseima kiirusega).

15. Laske katsutitel seista toatemperatuuril 20 minutit (esimene kinnitamine).
16. Korrake samme 11–13.
17. Lisage 5 ml kinnitit, nagu sammus 14.
18. Laske katsutitel seista toatemperatuuril 10 minutit (teine kinnitamine).
19. Korrake samme 16–18 (kolmas kinnitamine).
20. Nüüd võib kinnitatud rakupelletide kasutada kohe slaidi ettevalmistamiseks labori standardprotseduuride kohaselt või säilitada külmkapis (2–8 °C) tulevaseks kasutamiseks.

**SÄILITAMINE JA STABIILSUS**

CHANG Marrow tuleb hoida külmutatult temperatuuril –10 °C kuni kasutamiseni. CHANG Marrow on juhiste kohasel säilitamisel stabiilne pudeli etiketile märgitud kuupäevani. Pärast sulatamist võib kasutamata toote jagada tööalikoostidesse ja uuesti külmutada hilisemaks kasutamiseks või tihedalt korkida ja hoida temperatuuril 2–8 °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 Marrow sisaldab FBS ja GCT põhiseid söodet ning seda tuleb käidelda tavapäraselt laboratoorseste ettevaatusabinõudega. Sööde sisaldab antibiootikumi (gentamitsiinsulfaati), et vähendada bakteriaalse saaste võimalust, kuid söötme jaotamisel tuleb alati rakendada aseptilist tehnikat. Ärge kasutage ühtki söodet, mis ei ole punast värvi.

## FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

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

## TERMÉKISMERTETÉS

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

## ÖSSZETEVŐK

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

## MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

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

## SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS FELSZERELÉS

- Műanyag, steril centrifugacsövek és tenyésztőflaskák
- CO<sub>2</sub>-inkubátor 37 °C-on
- Asztali centrifuga
- Vortex keverő
- Kolcemid törzsoldat, 10 µg/ml
- Kálium-klorid oldat, 0,075 M
- Fixálóoldat, metanol:ecetsav (3:1)

## ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

A CHANG Marrow médiumot egy éjszakán át hűtőszekrényben (2–8 °C) kell felolvasztani, majd óvatosan össze kell keverni a homogenitási biztosítása érdekében. Aseptikusan adagoljon 10 ml médiumot a steril tenyésztőflaskákba, és ekvilibrálja 37 °C-ra a csontvelőtenyészetekhez történő azonnali felhasználáshoz.

## FELHASZNÁLÁSI UTASÍTÁSOK

Minta-előkészítés:

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

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

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

## Csontvelőtenyészet:

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

- 10,0 ml CHANG Marrow.
- Ekvilibrálja a flaskát 37 °C-ra a minta inokulációja előtt.
- Hemocitóméterrel határozza meg a minta fehérvérsejtszámát (WBC). Inokuláljon minden egyes tenyészetet a megfelelő mintamennyiséggel, hogy elérje az optimális 1×10<sup>6</sup> sejt/ml-es vagy 10×10<sup>6</sup> sejt/10 ml tenyészet koncentrációt.
- Minden egyes laboratóriumnak meg kell határoznia a tenyészetek létrehozott számát a beteg klinikai indikációjától függően. Szükség esetén további növekedési faktorokat is hozzáadhat. Helyezze az összes flaskát 37 °C-os inkubátorba az összegyűjtésig.

## A tenyészetek összegyűjtése:

- Vegye ki a tenyészeteket az inkubátorból, és óvatosan forgassa a sejtek újbóli felszuszpendálásához.
- Tegye át minden egyes flaska tartalmát egy-egy 15 ml-es centrifugacsőbe.
- Mindegyik csőhöz adjon 100 µl kolcemid törzsoldatot (10 µg/ml).
- Zárja le a csöveket, és keverje össze azokat a csövek fel-le fordításával.
- Inkubálja a csöveket 37 °C-on 20 percig.
- Az inkubálás után centrifugálja a csöveket 8 percig 1200 rpm-en (300 × g).
- Óvatosan szívja le a felülúszót az egyes csövekből.
- Szuszpendálja fel újra a sejt pelletet óvatosan összekeverve vagy mutatóujjal megpöccintve a cső alját.
- NAGYON LASSAN adjon 10 ml hipotóniás oldatot (0,075 M kálium-klorid) minden csőhöz (a legalacsonyabb értéken végzett) vortexelés közben.
- Hagyja a csöveket szobahőmérsékleten 20 percig állni (hipotóniás kezelés).
- Centrifugálja a csöveket 8 percig 1200 rpm-en (300 × g).
- Szívja le a felülúszót, körülbelül 1,0 ml hipotóniás oldatot hagyva a sejt pellet felett.

MEGJEGYZÉS: Ügyeljen a szálas anyagra, amely a centrifugálás után a sejt pelletből a felülúszóba kerülhet. Lehet, hogy az utolsó néhány ml felülúszót kézzel kell eltávolítani egy Pasteur-pipettával (nem vákuumszívással) a teljes sejt pellet hulladéktartályba szívásának elkerülése érdekében.

- Szuszpendálja fel újra a sejt pelletet a 8. lépésben leírtak szerint.

- NAGYON LASSAN adjon 10 ml frissen elkészített, módosított Carnoy-féle fixálószeret (3 rész abszolút metanol : 1 rész jegecet) minden csőhöz vortexelés közben (a legalacsonyabb értéken).

- Hagyja a csöveket szobahőmérsékleten 20 percig állni (első fixálás).

- Ismételje meg a 11–13. lépést.

- Adjon hozzá 5 ml fixálószeret, ahogy a 14. lépésben.

- Hagyja a csöveket szobahőmérsékleten 10 percig állni (második fixálás).

- Ismételje meg a 16–18. lépést (harmadik fixálás).

- Ekkor a fixált sejt pelletek azonnal felhasználhatók metszetkészítéshez a laboratórium standard protokollja szerint, vagy hűtőszekrényben (2 és 8 °C között) tárolhatók későbbi felhasználásra.

## TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

A CHANG Marrow médiumot fagyaszta, –10 °C alatt kell tárolni a felhasználásig. A CHANG Marrow 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, illetve szorosan lezárva 2–8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb 30 napig tárolható. Védje a fluoreszcens fénytől.

## ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

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

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



## LIETUVIŲ K.

### NAUDOJIMO INDIKACIJA

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

### ĮTAISO APRAŠYMAS

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

### SUDEDAMOSIOS DALYS

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

### KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

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

### REIKALINGOS, BET PAKUOTĖJE NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS IR ĮRANGA

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

### PARUOŠIMAS NAUDOTI

„CHANG Marrow“ 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, nusistovėjęs iki 37 °C būsenos, tuoj pat naudokite kaulų čiulpų ląstelių kultūroms.

### NAUDOJIMO INSTRUKCIJA

Mėginių ruošimas

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

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

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

### Kaulų čiulpų ląstelių kultūra

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

1. 10,0 ml „CHANG Marrow“ terpės.
2. Prieš užsėdami mėginio kultūrą, pasiekite, kad nusistovėtų 37 °C flakono turinio temperatūra.
3. Naudodami hemocitometrą, nustatykite leukocitų (WBC) kiekį mėginyje. Kiekvieną pasėlį užsėkite atitinkamu mėginio kiekiu, kad pasiektumėte optimalią 1 x 10<sup>6</sup> ląstelių/ml arba 10 x 10<sup>6</sup> ląstelių 10-yje ml pasėlio koncentraciją.
4. Kiekviena laboratorija turi nustatyti, kokį skaičių pasėlių paruošti priklausomai nuo paciento klinikinės indikacijos. Prireikus galima pridėti papildomų augimo faktorių. Visus flakonius sudėkite į 37 °C inkubatorių, kol bus galima surinkti kultūras.

### Kultūrų surinkimas

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

PASTABA. Reikia būti atsargiems, nes po centrifugavimo į viršnuosėdinį skystį iš nusėdusių ląstelių gali būti nusitęsusių skaidulinių medžiagų. Paskutinius kelis supernatanto mililitrus gali tekti nusiurbti Pastero pipete (nenaudojant vakuuminio siurbimo), kad į atliekų konteinerį nebūtų išsiurbta visa ląstelių nuosėdų masė.

13. Ląstelių nuosėdas resuspenduokite, kaip aprašyta 8 etape.
14. Purtydami sūkurinėje maišyklėje (lėčiausiu režimu), į kiekvieną mėgintuvėlį LABAI PALENGVA įpilkite po 10 ml šviežiai paruošto modifikuoto Kornua fiksatyvo (3 dalys absoliučiojo metanolio ir 1 dalis ledinės acto rūgšties).
15. Palikite mėgintuvėlius 20 minučių pastovėti kambario temperatūroje (pirmasis fiksavimas).
16. Pakartokite 11–13 etapus.
17. Įpilkite 5 ml fiksatyvo, kaip nurodyta 14 etape.
18. Palikite mėgintuvėlius 10 minučių pastovėti kambario temperatūroje (antrasis fiksavimas).
19. Pakartokite 16–18 etapus (trečiasis fiksavimas).
20. Šitaip užfiksuotą ląstelių kultūrą galima naudoti tuoj pat tepinėlių preparatams ruošti laboratorijoje nustatyta standartinė tvarka arba galima laikyti šaldytuve (2 °C–8 °C) vėlesniems tyrimams.

### LAIKYMAS IR STABILUMAS

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

### ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

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

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

## TÜRKÇE

### KULLANIM ENDİKASYONU

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

### CİHAZ TANIMI

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

### BİLEŞENLER

|                      |                            |                       |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| <u>Amino Asitler</u> | <u>Proteinler</u>          | <u>Antibiyotik</u>    |
| Alanin               | <u>Hormonlar</u>           | Gentamisin Sülfat     |
| Arjinin              | <u>ve Büyüme</u>           |                       |
| Asparajin            | <u>Faktörleri</u>          | <u>Diğer</u>          |
| Aspartik Asit        | Fetal siğir                | Biyotin               |
| Sistin               | serumu (FSS)               | Dev hücreli tümör     |
| Glutamik Asit        | hrGM-CSF                   | koşullandırılmış      |
| Glutamin             |                            | vasat (GCT-CM)        |
| Glisin               | <u>Tuzlar ve İyonlar</u>   |                       |
| Histidin             | Sodyum klorür              | <u>Vitaminler ve</u>  |
| İzöloşin             | Sodyum selenit             | <u>eser elemanlar</u> |
| Lösin                | Kalsiyum klorür            | Folik asit            |
| Lizin                | Kolin klorür               | Nikotinamid           |
| Metiyonin            | Potasyum klorür            | Riboflavin            |
| Fenilalanin          | Potasyum nitrat            | Tiyamin               |
| Prolin               | Magnezyum sülfat           | Pantotenik asit       |
| Serin                | Sodyum fosfat              | Kobalamin             |
| Treonin              |                            | Piridoksin            |
| Triptofan            | <u>Tamponlar</u>           |                       |
| Tirozin              | Sodyum bikarbonat          | <u>Su</u>             |
| Valin                | HEPES                      | Enjeksiyonluk Su      |
|                      |                            | Kalitesi              |
|                      | <u>Enerji Substratları</u> |                       |
|                      | Glukoz                     |                       |
|                      | Piruvat                    |                       |
|                      | Inositol                   |                       |

### KALİTE GÜVENÇE

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

### GEREKLİ AMA SAĞLANMAYAN MATERYAL VE EKİPMAN

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

### KULLANIM HAZIRLIĞI

CHANG Marrow buzdolabında (2°C - 8°C) gece boyunca çözülükten sonra homojenliği sağlamak için hafifçe karıştırılır. Steril kültür flasklarına aseptik olarak 10 mL vasat koyun ve kemik iliği kültürlerinde hemen kullanım için 37°C'ye dengeleyin.

### KULLANMA TALİMATI

Örnek Hazırlama:

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

- 5 mL üzerinde kemik iliği aspiratı alınırsa örnekte hemodilüsyon olabilir. Kemik iliği fraksiyonunu izole etmek için numuneyi 8 dakika boyunca 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.
- Numune transfer vasatında gelirse örneği 1200 devir/dk hızında 8 dakika santrifüjleyip transfer vasatını (süpernatant) alın. Tüpün altında kalan santrifüje edilmiş fraksiyonu kullanarak inokülasyon yapın.

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

### Kemik İliği Kültürü:

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

1. 10,0 mL CHANG Marrow
2. Numune inokülasyonundan önce flaskı 37°C'ye dengeleyin.
3. Bir hemasitometre kullanarak örnekte bir akyuvar sayımı yapın. Her kültüre 1 X 10<sup>6</sup> hücre/mL veya 10 mL kültür başına 10 X 10<sup>6</sup> hücre şeklinde optimum bir konsantrasyon elde etmek üzere uygun miktarda örnek inokülasyonu yapın.
4. Her ayrı laboratuvar hastanın klinik endikasyonuna göre kurulacak kültür sayısını belirlemelidir. İstenirse ek büyüme faktörleri eklenebilir. Toplama işlemine hazır oluncaya kadar tüm flaskları bir 37°C inkübatöre koyun.

### Kültürlerden Toplama:

1. Kültürleri inkübatörden çıkarın ve hücreleri tekrar süspansiyon haline getirmek için yavaşça çevirin.
2. Her flaskın içeriğini bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın.
3. Her tüpe 100 µL stok Colcemid (10 µg/mL) ekleyin.
4. Tüplerin kapağını kapatın ve ters düz ederek karıştırın.
5. Tüpleri 37°C'de 20 dakika inkübe edin.
6. İnkübasyondan sonra tüpleri 8 dakika boyunca 1200 devir/dk (300 x g) hızında santrifüjleyin.
7. Her tüpten süpernatantı dikkatle aspire edin.
8. Hücre pelletini hafifçe karıştırarak veya tüpün alt kısmına işaret parmağıyla fiske vurarak tekrar süspansiyon haline getirin.
9. ÇOK YAVAŞÇA vorteksleme sırasında (en düşük ayarda) her tüpe 10 mL hipotonik solüsyon (0,075 M Potasyum Klorür) ekleyin.
10. Tüpleri oda sıcaklığında 20 dakika bırakın (hipotonik muamele).
11. Tüpleri 8 dakika boyunca 1200 devir/dk (300 x g) hızında santrifüjleyin.
12. Süpernatantı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 1,0 mL hipotonik solüsyon bırakın.

NOT: Santrifüjlemeden sonra hücre pelletinden yukarıya süpernatant içine uzanabilecek fibröz materyal açısından dikkatli olun. En son birkaç mL süpernatantın tüm hücre pelletinin atık kabına aspirasyonundan kaçınmak üzere bir Pasteur pipetiyle (vakum aspirasyonu kullanmadan) alınması gerekebilir.

13. Hücre pelletini 8. adımda tanımlandığı gibi tekrar süspansiyon haline getirin.

14. ÇOK YAVAŞÇA 10 mL yeni hazırlanmış modifiye Carnoy fiksatifini (3 kısım mutlak metanol: 1 kısım glasiyal asetik asit) vorteksleme (en düşük ayarda) sırasında her tüpe ekleyin.

15. Tüpleri oda sıcaklığında 20 dakika bırakın (birinci sabitleme).
16. 11 - 13. adımları tekrarlayın.
17. Adım 14'teki gibi 5 mL fiksatif ekleyin.
18. Tüpleri oda sıcaklığında 10 dakika bırakın (ikinci sabitleme).
19. 16 - 18. adımları tekrarlayın (üçüncü sabitleme).
20. Bu noktada sabit hücre pelletleri laboratuvarın standart protokolüne göre lam hazırlama için hemen kullanılabilir veya gelecekte kullanım için buzdolabında (2°C - 8°C) saklanabilir.

### SAKLAMA VE STABİLİTE

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

### ÖNLEMLER VE UYARILAR

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

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

## SLOVENČINA

### INDIKÁCIA NA POUŽITIE

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

### POPIS ZARIADENIA

CHANG Marrow je médium určené na priame použitie obsahujúce IMDM, s FBS, pufrom HEPES, L-glutamínom, médium upraveným veľkobunkovým karcinómom (GCT), rekombinantným ľudským GM-CSF a gentamicínsulfátom. CHANG Marrow je optimalizované na podporu účinného rastu buniek kostnej drene na cytogenetickú analýzu. Pred kultiváciou kostnej drene sa nevyžaduje prídanie žiadnych komponentov. CHANG Marrow obsahuje gentamicínsulfát (50 mg/l). Ak chcete, možno pridať ďalšie antibiotiká.

### ZLOŽKY

| <u>Aminokyseliny</u> | <u>Bielkoviny, hormóny</u> | <u>Antibiotikum</u>    |
|----------------------|----------------------------|------------------------|
| alanín               | <u>a rastové faktory</u>   | gentamicínsulfát       |
| arginín              | fetálne bovinné            |                        |
| asparagín            | sérum (FBS)                | <u>Iné</u>             |
| kyselina             | hrGM-CSF                   | biotín                 |
| asparágová           |                            | médium upravené        |
| cystín               | <u>Soli a ióny</u>         | veľkobunkovým          |
| kyselina glutámová   | chlorid sodný              | karcinómom             |
| glutamín             | seleničitan sodný          | (GCT-CM)               |
| glycín               | chlorid vápenatý           | <u>Vitamíny</u>        |
| histidín             | cholin vápenatý            | <u>a stopové prvky</u> |
| izoleucín            | chlorid draselný           | kyselina listová       |
| leucín               | dusičnan draselný          | nikotínamid            |
| lyzín                | síran horečnatý            | riboflavín             |
| metionín             | fosfát sodný               | tiamín                 |
| fenyľalanín          |                            | kyselina               |
| prolín               | <u>Pufre</u>               | pantoténová            |
| serín                | hydrogénuhlíčen            | kobalamín              |
| treonín              | sodný                      | pyridoxín              |
| tryptofán            | HEPES                      |                        |
| tyrozin              |                            |                        |
| valín                | <u>Energetické</u>         | <u>Voda</u>            |
|                      | <u>substráty</u>           | kvalita vody           |
|                      | glukóza                    | na injekciu            |
|                      | pyruvát                    |                        |
|                      | inositol                   |                        |

### KONTROLA KVALITY

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

### VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY A VYBAVENIE

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

### PRÍPRAVA NA POUŽITIE

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

### NÁVOD NA POUŽITIE

Príprava vzorky:

Použite 0,5 až 1,0 ml aspirátu kostnej drene ošetrovaného heparínom sodným. Litium heparín, EDTA alebo citrátové antiokoagulancia sú nevhodné na cytogenetické štúdie.

- Ak dostanete viac než 5 ml aspirátu kostnej drene, vzorka môže byť zriedená krvou. Vzorku odstredíte pri 1 200 otáčok za minútu 8 minút, aby sa izolovala frakcia kostnej drene.
- Ak vzorka príde v prenosnom médiu, odstredíte ju pri 1 200 otáčok za minútu 8 minút a odstráňte prenosné médium (supernatant). Zaočkujte s použitím zvyšnej odstredenej frakcie na spodku skúmavky.

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

### Kultivácia kostnej drene:

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow
2. Fľaštičku ustáťte na teplotu 37 °C pred naočkováním vzorky.
3. Pomocou hemocytometra stanovte počet bielych krviniek (WBC) vo vzorke. Každú kultúru naočkujte primeraným množstvom vzorky, aby sa dosiahla optimálna koncentrácia 1 x 10<sup>6</sup> buniek/ml alebo 10 x 10<sup>6</sup> buniek na 10 ml kultúry.
4. Každé jednotlivé laboratórium si má určiť počet kultúr na stanovenie podľa klinickej indikácie pacientky. Ak chcete, možno pridať ďalšie rastové faktory. Všetky fľaštičky vložte do inkubátora s teplotou 37 °C, kým nebudú pripravené na zber.

### Zber kultúr:

1. Kultúry vyberte z inkubátora a jemne zavíрте, aby sa bunky resuspendovali.
2. Obsah každej fľaštičky preneste do 15 ml skúmavky na odstredovanie.
3. Do každej skúmavky pridajte 100 µl kmeňového Colcemidu (10 µg/ml).
4. Na skúmavky nasadte vrchnáky a premieľajte prevrátením.
5. Skúmavky inkubujte pri teplote 37 °C 20 minút.
6. Po inkubácii skúmavky odstredíte 8 minút pri 1 200 otáčok za minútu (300 x g).
7. Z každej skúmavky pozorne aspirujte supernatant.
8. Bunkovú peletu resuspendujte jemným zmiešaním alebo poklepaním dna skúmavky ukazovák.
9. VELMI POMALY pridajte do každej skúmavky 10 ml hypotonického roztoku (0,075 M chloridu draselného) za vírenia (na najnižších obrátkach).
10. Skúmavky nechajte odstáť pri izbovej teplote 20 minút (hypotonické ošetrovanie).
11. Skúmavky odstredíte 8 minút pri 1 200 otáčok za minútu (300 x g).
12. Aspirujte supernatant, pričom ponechajte asi 1,0 ml hypotonického roztoku nad bunkovou peletou.

POZNÁMKA: Dávajte pozor na vláknitý materiál, ktorý môže trčať z bunkovej pelety do supernatantu po odstredení. Posledných pár ml supernatantu môže byť potrebné odstrániť ručne Pasteurovou pipetou (bez použitia vákuového odsávania), aby sa do odpadovej nádoby neaspirovala celá bunková peleta.

13. Bunkovú peletu resuspendujte tak, ako je popísané v kroku 8.

14. VELMI POMALY pridajte 10 ml čerstvo pripraveného modifikovaného fixačného roztoku Carnoy (3 časti absolútny metanol : 1 časť ľadová kyselina octová) do každej skúmavky za vírenia (na najnižších obrátkach).

15. Skúmavky nechajte odstáť pri izbovej teplote 20 minút (prvá fixácia).
16. Zopakujte kroky 11 – 13.
17. Pridajte 5 ml fixačného roztoku tak ako v kroku 14.
18. Skúmavky nechajte odstáť pri izbovej teplote 10 minút (druhá fixácia).
19. Zopakujte kroky 16 – 18 (tretia fixácia).
20. V tomto bode možno zafixované bunkové pelety okamžite použiť na prípravu sklíčok podľa štandardného protokolu laboratória alebo uchovať v chladničke (2 °C – 8 °C) na budúce použitie.

### UCHOVÁVANIE A STABILITA

CHANG Marrow sa má uchovávať pri teplote pod -10 °C, až kým nebude pripravené na použitie. CHANG Marrow bude stabilné až do dátumu expirácie vytačeného na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazené. Po rozmrazení všetok nepoužitý produkt možno nadávkovat' do pracovných alíkvot a znovu zmraziť na neskoršie použitie, alebo tesne nasadiť vrchnák a uchovávať pri teplote 2 °C – 8 °C do 30 dní. Chránite 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 Marrow obsahuje médium upravené pomocou FBS a GCT a musí sa s ním manipulovať s použitím všeobecných laboratórnych bezpečnostných opatrení. Médium obsahuje antibiotikum (gentamicínsulfát) na zníženie možnosti bakteriálnej kontaminácie, no pri dávkovaní média sa vždy musia použiť aseptické techniky. Nepoužívajte žiadne médium, ktoré nemá červenú farbu.



**ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА**

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

**ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО**

CHANG Marrow е готова за употреба среда, която се състои от IMDM с FBS (фетален говежди серум), буфер HEPES, L-глутамин, Giant Cell Tumor (GCT) Conditioned Medium (кондиционирана среда от гигантскоклетъчен тумор (GCT)), рекомбинантен човешки гранулоцитно-макрофаген колониен стимулиращ фактор (GM-CSF) и гентамицин сулфат. CHANG Marrow е оптимизирана да поддържа ефективен растеж на клетки на костен мозък за цитогенетичен анализ. Не е необходимо добавяне на компоненти преди култивиране на костен мозък. CHANG Marrow съдържа гентамицин сулфат (50 mg/l). По желание могат да бъдат добавени допълнителни антибиотици.

**КОМПОНЕНТИ**

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

**КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО**

Няколко фактора, включително източника на спесимени, състоянието на културите и избора на реагенти, могат да повлияят на получения резултат. На потребителите се препоръчва всяка нова партида реагент да се изпълнява паралелно с референтен материал с установена подходяща активност преди въвеждане в рутинна употреба. Всяка партида CHANG Marrow е тествана за ефективност върху клинични култури на костен мозък в независима клинична лаборатория по цитогенетика спрямо контролна среда. Резултатите са посочени в конкретния за партидата Сертификат за анализ.

**НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ И ОБОРУДВАНЕ, КОИТО НЕ СА ДОСТАВЕНИ**

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

**ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА**

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

**ИНСТРУКЦИИ ЗА УПОТРЕБА**

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

- Ако е получен аспират на костен мозък повече от 5 ml, пробата може да е хемодилут (примесена с кръв). Центрофугирайте спесимена при 1200 грм за 8 минути, за да изолирате фракцията костен мозък.
- Ако спесименът пристигне в трансферна среда, центрофугирайте пробата при 1200 грм за 8 минути и отстранете транспортната среда (супернатант). Инокулирайте, като използвате останалата центрофугирана фракция на дъното на епруветката.

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

**Култура на костен мозък:**

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

1. 10,0 ml CHANG Marrow
2. Еквилибрирайте слайд-флакона до 37° C преди инокулацията на спесимена.
3. С помощта на хемоцитометър извършете броење на бели кръвни клетки (WBC) на пробата. Инокулирайте всяка култура с подходящо количество проба, за да постигнете оптимална концентрация от 1 X 10<sup>5</sup> клетки/ml или 10 X 10<sup>6</sup> клетки на 10 ml култура.
4. Всяка отделна лаборатория трябва да определи броя култури, които да подготви, в зависимост от клиничните показания на пациента. По желание могат да бъдат добавени допълнителни растежни фактори. Поставете всички слайд-флаconi в 37° C инкубатор до момента, в който са готови за събиране.

**Събиране на културите:**

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

10. Оставете епруветките на стайна температура за 20 минути (хипотонично третиране).
11. Центрофугирайте епруветките за 8 минути при 1200 грм (300 x g).
12. Аспирирайте супернатанта, като оставите около 1,0 ml хипотоничен разтвор над пелетата от клетки. **ЗАБЕЛЕЖКА:** Бъдете внимателни за влакнест материал, който може да се подава извън пелетата от клетки и да достига до супернатанта след центрофугиране. Последните няколко ml супернатант може да е необходимо да се отстранят на ръка с помощта на пипета тип Пастър (без използване на вакуумна аспирация), за да се избегне аспириране на цялата пелета от клетки в контейнера за отпадък.
13. Ресуспендирайте пелетата от клетки, както е описано в стъпка 8.
14. МНОГО БАВНО добавете 10 ml прясно приготвен модифициран фиксиращ разтвор на Карной (3 части чист метанол: 1 част ледена оцетна киселина) към всяка епруветка, докато размесвате с вихров миксер (при най-ниската настройка).
15. Оставете епруветките на стайна температура за 20 минути (първо фиксиране).
16. Повторете стъпки 11 – 13.
17. Добавете 5 ml фиксиращ разтвор, както в стъпка 14.
18. Оставете епруветките на стайна температура за 10 минути (второ фиксиране).
19. Повторете стъпки 16 – 18 (трето фиксиране).
20. На този етап фиксираните пелети от клетки могат да се използват незабавно за приготвяне на слайд съгласно стандартния протокол на лабораторията или да се съхранят в хладилник (2 – 8° C) за бъдеща употреба.

**СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ**

CHANG Marrow трябва да се съхранява замразена при температура под -10° C до момента на използването ѝ. CHANG Marrow 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 разделено в работни аликвотни части и замразено отново за употреба на по-късен етап или да бъде пълтно затворено с капачка и съхранено при температура от 2° C до 8° C за до 30 дни. Пазете от флуоресцентна светлина.

**ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ**

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

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

## INDIKACIJE ZA UPOTREBU

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

## OPIS PROIZVODA

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

## KOMPONENTE

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

## OSIGURANJE KVALITETE

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

## POTREBNI MATERIJALI I OPREMA KOJI NISU PRILožENI

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

## PRIPREMA ZA UPOTREBU

Medij CHANG Marrow 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.

## UPUTE ZA UPOTREBU

Priprema uzorka:

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

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

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

## Kultura koštane srži:

na svim posudama s kulturama navesti ime pacijenta, broj uzorka i vrstu kulture. Za svaku kulturu pripremiti tikvicu koja sadrži:

1. 10,0 ml medija CHANG Marrow
2. Prije inokulacije uzorka uravnotežiti tikvicu na 37 °C.
3. Hemocitometrom utvrditi broj leukocita u uzorku. Inokulirati svaku kulturu odgovarajućom količinom uzorka kako bi se postigla optimalna koncentracija od 1 x 10<sup>6</sup> stanica/ml ili 10 x 10<sup>6</sup> stanica u svakih 10 ml kulture.
4. Svaki laboratorij mora utvrditi broj kultura koje mora pripremiti ovisno o kliničkim indikacijama pacijenta. Po želji se mogu dodati dodatni čimbenici rasta. Staviti sve tikvice u inkubator na 37 °C dok kulture ne budu spremne za prikupljanje.

## Prikupljanje kultura:

1. Izvaditi kulture iz inkubatora i lagano promućkati kako bi se obnovila suspenzija stanica.
2. Prenijeti sadržaj svake tikvice u epruvetu od 15 ml za centrifugu.
3. U svaku epruvetu dodati 100 µl temeljne standardne otopine kolcemida (10 µg/ml).
4. Začepiti epruvete i miješati prevrtanjem.
5. Inkubirati epruvete 20 minuta na 37 °C.
6. Nakon inkubacije centrifugirati epruvete 8 minuta na 1200 o/min (300 x g).
7. Pažljivo aspirirati supernatant iz svake epruvete.
8. Obnoviti suspenziju taloga stanica lagano miješajući ili lupkajući dno epruvete kažiprstom.
9. VRLO POLAKO dodavati 10 ml hipotonične otopine (0,075 mol/l kalijevog klorida) u svaku epruvetu dok su epruvete u vrtložnoj miješalici (koja je postavljena na najnižu postavku).
10. Ostaviti epruvete da miruju na sobnoj temperaturi 20 minuta (hipotonična obrada).
11. Centrifugirati epruvete 8 minuta na 1200 o/min (300 x g).
12. Aspirirati supernatant i ostaviti otprilike 1,0 ml hipotonične otopine iznad taloga stanica.

NAPOMENA: paziti na vlaknasti materijal koji se može protezati iz taloga stanica u supernatant nakon centrifuge. Možda će biti potrebno ručno ukloniti posljednjih nekoliko ml supernatanta koristeći se Pasteurovom pipetom (ne vakuuskom aspiracijom) da ne bi došlo do aspiracije čitavog taloga stanica u spremnik za otpad.

13. Obnoviti suspenziju taloga stanica kako je opisano u 8. koraku.

14. VRLO POLAKO dodavati 10 ml svježe pripremljenog modificiranog Carnoyevog fiksativa (3 dijela apsolutnog metanola i 1 dio ledene octene kiseline) u svaku epruvetu dok su epruvete u vrtložnoj miješalici (koja je postavljena na najnižu postavku).

15. Ostaviti epruvete da miruju na sobnoj temperaturi 20 minuta (prva fiksacija).
16. Ponoviti korake 11. – 13.
17. Dodati 5 ml fiksativa kako je opisano u 14. koraku.
18. Ostaviti epruvete da miruju na sobnoj temperaturi 10 minuta (druga fiksacija).
19. Ponoviti korake 16. – 18. (treća fiksacija).
20. Sada se fiksirane taloge stanica može odmah upotrijebiti za pripremu stakalaca u skladu sa standardnim protokolom laboratorija ili ih se može pohraniti u hladnjaku (2 – 8 °C) za upotrebu u budućnosti.

## POHRANA I STABILNOST

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

## MJERE OPREZA I UPOZORENJA

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

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

## MALTI

### INDIKAZZJONI GHALL-UŻU

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

### DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

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

### KOMPONENTI

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

### ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

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

### MATERJALI U TAGHMIR MEHTIEĠ IŻDA MHUX IPROVDUT

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

### PREPARAZZJONI GHALL-UŻU

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

### ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Preparazzjoni tal-Kampjun:

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

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

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

### It-Tkabbir tal-Mudullun:

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

1. 10.0 mL CHANG Marrow.
2. Ekwilibra l-flask għal temperatura ta' 37°C qabel l-inokulazzjoni tal-kampjun.
3. Permezz ta' emocitometru, aghmel test għall-ghadd ta' ċelloli bojod tad-demem (WBC) tal-kampjun. Inokula kull koltura bl-ammont xieraq tal-kampjun sabiex tiħaq il-konċentrazzjoni ottima ta' 1 x 10<sup>6</sup> ċelloli/mL jew 10 x 10<sup>6</sup> ċelloli għal 10 mL tal-koltura.
4. Kull laboratorju individwali għandu jiddetermina n-numru ta' kolturi li għandu jipprepara skont l-indikazzjoni klinika tal-pazjent. Jistgħu jżiedu fatturi tat-tkabbir addizzjonali jekk ikun mixtieq. Poġġi l-flasks kollha f'inkubatur f'temperatura ta' 37°C sakemm ikunu lesti għall-ħsad.

### Il-ħsad tal-Kolturi:

1. Nehhi l-kolturi mill-inkubatur u dawwar bil-mod sabiex terġa' tissospendi ċ-ċelloli.
2. Itrasferixxi l-kontenut ta' kull flask għal flask ta' 15 mL taċ-ċentrifugu.
3. Żid 100 µL tas-soluzzjoni ewlenija ta' Colcemid (10 µg/mL) f'kull tubu.
4. Aghlaq it-tubi u ħawwad billi taqlibhom 'l isfel.
5. Inkuba t'tubi f'temperatura ta' 37°C għal 20 minuta.
6. Wara l-inokulazzjoni, iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1200 rpm (300 x g).
7. Bir-reqqa aspira s-supernatant minn kull tubu.
8. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli billi tħawwad bil-mod, jew billi tagħti daqqa ħafifa lill-qiegħ tat-tubu bl-ewwel saba'.
9. BIL-MOD ĦAFNA žid 10 mL ta' soluzzjoni ipotonika (0.075 M Potassium Chloride) lil kull tubu filwaqt li ddawwar f'vortex (fuq l-inqas setting).
10. Ħalli t-tubi joqogħdu f'temperatura ambjentali għal 20 minuta (trattament ipotoniku).
11. Iċċentrifuga t-tubi għal 8 minuti fuq 1200 rpm (300 x g).
12. Aspira s-supernatant u ħalli madwar 1.0 mL tas-soluzzjoni ipotonika fuq il-gerbuba taċ-ċelloli.

NOTA: Oqgħod attent għall-materjal fibruż li jista' jestendi mill-gerbuba taċ-ċelloli 'l fuq għal ġos-supernatant wara ċ-ċentrifugazzjoni. Jista' jkun li l-aħħar f'it mL tas-supernatant ikollhom jitneħħew manwalment b'pipetta Pasteur (mhux bl-użu ta' aspirazzjoni b'vakum) sabiex jiġi evitat li l-gerbuba taċ-ċelloli kollha tiġi aspirata fil-kontenitur tal-iskart.

13. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli kif deskritt fil-punt 8.

14. BIL-MOD ĦAFNA žid 10 mL ta' preparazzjoni friska ta' fissativ ta' Carnoy immodifikat (3 partijiet methanol assolut: parti 1 ta' glacial acetic acid) lil kull tubu waqt li tħawwad fil-vortex mixer (fuq l-inqas setting).

15. Ħalli t-tubi joqogħdu f'temperatura ambjentali għal 20 minuta (l-ewwel fissazzjoni).

16. Irrepeti l-punti 11-13.

17. Żid 5 mL tal-fissativ bħal fil-punt 14.

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

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

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

### ĦAŻNA U STABBILTÀ

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

### PREKAWZJONIJIET U TWISSIJIET

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

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



**INDIKACIJE ZA UPORABO**

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

**OPIS PRIPOMOČKA**

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

**KOMPONENTE**

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

**ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI**

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

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

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

**PRIPRAVA ZA UPORABO**

Medij CHANG Marrow 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.

**NAVODILA ZA UPORABO**

Priprava vzorcev:

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

- Če prejmete več kot 5 ml aspirata kostnega mozga, je vzrok lahko v hemodiluciji vzorca. V tem primeru vzorec 8 minut centrifugirajte pri 1200 vrt./min, da izolirate frakcijo kostnega mozga.
- Če vzorec prejmete v mediju za prenos, ga 8 minut centrifugirajte pri 1200 vrt./min in odstranite medij za prenos (supernatant). Inokulirajte z uporabo preostale centrifugirane frakcije na dnu epruvete.

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

**Gojitev kostnega mozga:**

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

1. 10,0 ml medija CHANG Marrow.
2. Pred inokulacijo vzorca bučko uravnotežite na 37 °C.
3. S hemocitometrom preštejte število belih krvnih celic (BKS) v vzorcu. Vsako kulturo inokulirajte z ustrežno količino vzorca, da dobite optimalno koncentracijo 1 X 10<sup>6</sup> celic/ml ali 10 X 10<sup>6</sup> celic na 10 ml kulture.
4. Število kultur, ki jih je treba pripraviti glede na bolnikovo klinično indikacijo, se določi v vsakem posameznem laboratoriju. Po želji lahko dodate rastne faktorje. Vse bučke postavite v inkubator s temperaturo 37 °C, dokler kulture niso pripravljene, da jih spravite.

**Pobiranje kultur:**

1. Kulture vzemite iz inkubatorja in jih nežno sukajte, da ponovno suspendirate celice.
2. Vsebino vsake bučke prenesite v 15 ml centrifugirno epruveto.
3. V vsako epruveto dodajte 100 µl osnovne raztopine kolcemida (10 µg/ml).
4. Epruvete zaprite in premešajte vsebino z obračanjem.
5. Epruvete 20 minut inkubirajte pri temperaturi 37 °C.
6. Po inkubaciji epruvete 8 minut centrifugirajte pri 1200 vrt./min (300 x g).
7. Previdno aspirirajte supernatant iz vsake epruvete.
8. Celično usedlino ponovno suspendirajte tako, da jo narahlo premešate ali s kazalcem frcate po spodnjem delu epruvete.
9. ZELO POČASI dodajte 10 ml hipotonične raztopine (0,075 M kalijevega klorida) v vsako epruveto med mešanjem v vrtničnem mešalniku (pri najnižji nastavitvi).
10. Epruvete naj 20 minut počivajo pri sobni temperaturi (hipotonična obdelava).
11. Epruvete 8 minut centrifugirajte pri 1200 vrt./min (300 x g).
12. Aspirirajte supernatant, tako da nad celično usedlino ostane približno 1,0 ml hipotonične raztopine.  
OPOMBA: Pazite na vlaknasto snov, ki se po centrifugiranju lahko širi iz celične usedline v supernatant. Zanjih nekaj ml supernatanta boste morda morali ročno odstraniti s Pasteurjevo pipeto (ne z vakuumsko aspiracijo), da preprečite aspiracijo celotne celične usedline v posodo za odpadke.
13. Ponovno suspendirajte celično usedlino, kot je opisano v 8. koraku.

14. V vsako epruveto ZELO POČASI dodajte 10 ml sveže pripravljene modifikiranega fiksativa po Carnoyu (3 deli absolutnega metanola: 1 del ledocetne kisline) med mešanjem v vrtničnem mešalniku (pri najnižji nastavitvi).
15. Epruvete naj 20 minut počivajo pri sobni temperaturi (prvo fiksiranje).
16. Ponovite korake od 11 do 13.
17. Dodajte 5 ml fiksativa kot v 14. koraku.
18. Epruvete naj 10 minut počivajo pri sobni temperaturi (drugo fiksiranje).
19. Ponovite korake od 16 do 18 (tretje fiksiranje).
20. Na tej točki se lahko fiksirani celični peleti takoj uporabijo za pripravo preparatov skladno s standardnim protokolom laboratorija ali shranijo v hladilnik (2–8 °C) za nadaljnjo uporabo.

**SHRANJEVANJE IN STABILNOST**

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

**PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA**

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

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