

Zweckbestimmung

Marrowgrow dient der Kultivierung von Knochenmark und leukämischen Blutzellen. Es ist für die humangenetische *in-vitro* Diagnostik bestimmt.

Zusammensetzung

Basalmedium, vorgetestetes FBS, Hormone und Wachstumsfaktoren, Phenolrot, Pufferung durch NaHCO₃; beinhaltet Gentamycin und L-Glutamin.

Haltbarkeit und Lagerung

Ungeöffnetes Marrowgrow ist bei einer Lagerung ≤-18 °C für 18 Monate ab Herstellungsdatum haltbar. Nach Anbruch die Flasche bei +2°C bis +8°C lagern und maximal noch 7 Tage verwenden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

Auftauen

Marrowgrow Medium bei +2 °C bis +8 °C über Nacht auftauen. Ein Auftauen im Wasserbad bei 37°C wird nicht empfohlen. Vor Gebrauch Marrowgrow Medium gut mischen. Der normale pH-Wert beträgt 7,2 wie durch den Phenolrot-Indikator angezeigt wird. Im Fall einer pH Abweichung (gelb oder pink) wird der pH-Wert durch Inkubation der leicht geöffneten Flasche (ca. ¼ Drehung des Deckels) in einem 5% CO₂ Inkubator äquilibriert, bis das Medium die normale Farbe Rot erreicht hat. M Medium enthält keine Komponenten deren Qualität durch pH Schwankungen von +/- 2 beeinträchtigt werden. Angewärmtes Medium bei 37°C und korrektem pH- Wert sorgt für einen optimalen Start der Kultur.

Standardprotokoll

Die beschriebene Methode ist eine Anleitung für den Einsatz von Marrowgrow zur Kultivierung von Knochenmarkszellen. Marrowgrow ist unter aseptischen Bedingungen abgefüllt. Die Erhaltung der Sterilität des Produktes ist für die Verwendung in der *in vitro* Diagnostik notwendig und muss vom Anwender strikt eingehalten werden. Selbstverständlich kann dieses hochwertige Medium in den eigenen Arbeitsablauf integriert werden. Es obliegt dem Anwender, ob die u. a. Protokolle vollständig oder nur teilweise in die eigenen Protokolle übernommen werden.

1. Wenn eine Knochenmarkprobe im Transportmedium oder von einem Patienten mit Chemotherapie empfangen wird, zentrifugieren Sie 10 Minuten lang bei 150–170 g. Für in Heparin erhaltenes Knochenmark gehen Sie direkt zu Schritt 3.
2. Entfernen Sie den Überstand ohne das Pellet zu berühren.
3. Geben Sie 5 ml Marrowgrow in jedes der Röhrrchen.
4. Aussaat mit der entsprechenden Menge Knochenmark mit sterilen Pasteurpipetten (entsprechend der Zellzahl). Die Endkonzentration der Zellen sollte 106/ml pro Kultur betragen.
5. Kulturen gemäß vorläufiger Diagnose anlegen:
 - a) Direkte Kulturen: Hinzufügen von 100µl Colcemid-Lösung für 1-2 Stunden
 - b) Kurzzeitkulturen: über Nacht inkubieren. Addieren Sie am nächsten Morgen 100µl Colcemid-Lösung für 1-2 Stunden
 - c) Einwirkung von Colcemid über Nacht: addieren 50µl Colcemid-Lösung möglichst spät am Tag. Über Nacht bei 37°C inkubieren.
 - d) Kurzzeitkultur + Colcemid-Exposition über Nacht: 24, 48 oder 72 h lang bei 37 °C inkubieren. Dann wie Schritt 5. c).
 - e) B-Zell-stimulierte Kulturen: 100 µl PMA und/oder PWM hinzufügen und 2-4 Tage bei 37°C inkubieren. 100µl Colcemid-Lösung hinzugeben und über Nacht bei 37°C inkubieren.
 - f) T-Zell-stimulierte Kulturen: 100µl PHA hinzufügen und 72 h bei 37°C inkubieren. 100µl Colcemid Lösung für 1-2h hinzugeben.

Ernteprotokoll für Knochenmarkszellen

1. Die Röhrrchen für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugieren.
2. Überstand entfernen.
3. Pellet resuspendieren.
4. Geben Sie 6 ml vorgewärmtes KCL hinzu und inkubieren Sie die Röhrrchen 20 Minuten lang bei 37 °C im Wasserbad.
5. Zentrifugieren Sie die Röhrrchen 5 Minuten lang bei 1500 U/min.
6. Überstand entfernen.
7. Geben Sie 5 ml Fixiermittel (3 Methanol: 1 Essigsäure) in das Röhrrchen. Fügen Sie langsam ein paar Tropfen Fixativ hinzu und mischen Sie vorsichtig. Fügen Sie auf diese Weise Fixativ hinzu, bis sich alle Zellklumpen aufgelöst haben und die Zellsuspension möglichst gleichmäßig ist.
8. Zentrifugieren Sie bei 1500 U/min für 5 Minuten.
9. Wiederholen Sie die Schritte 9-10 zweimal.
10. Entfernen Sie nach dem letzten Waschen den Überstand so nah wie möglich am Pellet und resuspendieren Sie dann in so viel Fixativ, wie für die Objektträgerherstellung erforderlich ist.

Wahl der Methode(von Rooney DE et al).

Es stehen mehrere Methoden zur Verfügung, und die Wahl der Methode hängt stark von der zu untersuchenden Erkrankung ab. Empfohlene Behandlungsschemata sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Diagnose	Probe	Minimum Kulturen	Extras
CGL/CML	PB/BM	ONC, S	D, 48h

AML (außer APL)	BM/PB	ONC, S	24h, 48h
APL	BM/PB	ONC, 24h, S	48h
MDS	BM	ONC, S	24h, 72h ONC
MPD	BM	ONC, S	24h, 72h ONC
ALL (non B/T)	BM/PB	ONC, S	D, 24h, 48h
ALL (T cell)	BM/PB	ONC, S	D, 24h, 48h, 3d
ALL (B cell)	BM/PB	ONC, 3d + PMA 5d + PMA; 2d + PHA	D, S, 24h, 48h
CLL (B cell)	PB/BM	ONC, 3d + PMA 5d + PMA; 2d + PHA	3d
CLL (T cell)	PB/BM	ONC, 3d + PHA 3d PMA	3d
T-cell lymphoma	LN/BM	ONC, 3d + PHA 3d + PMA	3d
B-cell lymphoma	LN/BM	ONC, 3d + PMA 5d + PMA	3d
Andere lymphomatische Erkrankungen	BM	ONC, 3d +/- PMA 5d +/- PMA	S

APL: akute Promyelozytenleukämie; MPD: myeloproliferative Störung; PB: peripheres Blut; BM: Knochenmark; LN: Lymphknoten; ONC: Colcemid-Exposition über Nacht; S: synchronisierte Kultur; PHA: Phytohämagglutinin; PMA: 4-Phorbol-12-Myristat-13-Acetat.

Wichtige Anmerkungen

- Es können sich gelegentlich Kalziumoxalatkristalle bilden, die aber bislang keine negativen Einflüsse auf das Zellwachstum gezeigt haben.
- Das Auftauen in einem Wasserbad bei 37°C sollte vermieden werden, da sich da Präzipitate bilden können.












Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Die Erhaltung der Sterilität des Produktes ist für die Verwendung notwendig und muss vom Anwender strikt eingehalten werden.
- Nicht für die therapeutische Anwendung mit Menschen oder Tieren geeignet.
- Anwendung nur durch geschultes Fachpersonal.
- Keine Flaschen verwenden, deren Verpackung beschädigt wurde.
- Marrowgrow Medium nicht über dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum verwenden.
- Die Patientenproben sind biologisches Material und somit sind Sicherheitsvorkehrungen gemäß den lokalen Bestimmungen zur Arbeit mit potenziell infektiösem Material zu treffen.
- Cytogen GmbH garantiert keinen Erfolg der diagnostischen Testung allein durch die Verwendung von Cytogen Produkten.
- Melden Sie schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit diesem Produkt aufgetreten sind an den Hersteller und die zuständigen Behörden.

CE Kennzeichnung

Mit Marrowgrow bietet Cytogen ein CE gekennzeichnetes Medium, welches den regulatorischen Anforderungen an *in-vitro*-Diagnostika, festgelegt durch die Europäische Kommission, entspricht.

Symbolerläuterung

	Gebrauchsanweisung beachten		Hersteller
	In-vitro-Diagnostikum		Herstellungsdatum
	Artikelnummer		Sterilisiert mit aseptischen Verfahren
	Fertigungslosnummer, Charge		Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden
	Verwendbar bis		Vor Sonnenlicht schützen
	Temperaturbegrenzung		

Hersteller



Cytogen Produkte für Medizin + Forschung GmbH
Nordwalder Str. 120
48268 Greven
Germany

Tel. +49 2571 560180
Fax +49 2571 9219118
E-Mail: info@cytogen.net
Web: www.cytogen.net

