

Usage prévu

CytogenMarrow sert à la culture de la moelle osseuse et des cellules sanguines leucémiques. Il est destiné au diagnostic humain *in-vitro*.

Composition

Milieu basal, FBS pré-testé, hormones et facteurs de croissance, rouge phénolique, tamponnage par NaHCO₃ ; comprend la gentamycine et la L-glutamine.

Durée de conservation et de stockage

CytogenMarrow non ouvert peut être conservé pendant 18 mois à partir de la date de fabrication s'il est stocké à une température ≤-18 °C. Après ouverture, conserver le flacon entre +2 °C et +8 °C et continuer à l'utiliser pendant 7 jours au maximum. Éviter la décongélation et la congélation répétées.

Décongeler

Décongeler CytogenMarrow Medium à une température de +2 °C à +8 °C pendant une nuit. Une décongélation au bain-marie à 37 °C n'est pas recommandée. Bien mélanger CytogenMarrow Medium avant utilisation. Le pH normal est de 7,2, comme l'indique l'indicateur rouge phénolique. En cas d'écart de pH (jaune ou rose), le pH est déterminé par incubation du flacon légèrement ouvert (env. ¼ de tour du couvercle) dans un incubateur à 5 % de CO₂ jusqu'à ce que le milieu atteigne la couleur rouge normale. M Medium ne contient pas de composants dont la qualité peut être affectée par des variations de pH de +/- 2. Un milieu chauffé à 37 °C et un pH correct garantissent un démarrage optimal de la culture.

Protocole standard

La méthode décrite est un guide pour l'utilisation de CytogenMarrow pour la culture de cellules de moelle osseuse. CytogenMarrow est conditionné dans des conditions aseptiques. Le maintien de la stérilité du produit est nécessaire pour son utilisation dans le diagnostic *in vitro* et doit être strictement

respecté par l'utilisateur. Bien entendu, ce milieu de haute qualité peut être intégré dans le propre processus de travail. Il appartient à l'utilisateur de décider si les protocoles, entre autres, doivent être repris intégralement ou seulement partiellement dans ses propres protocoles.

1. Si un échantillon de moelle osseuse est reçu dans le milieu de transport ou par un patient sous chimiothérapie, centrifuger 150 à 170 g pendant 10 minutes. Pour la moelle osseuse obtenue dans l'héparine, passez directement à l'étape 3.
2. Retirez le surnageant sans toucher le culot.
3. Verser 5 ml de CytogenMarrow dans chacun des tubes.
4. Semis avec la quantité appropriée de moelle osseuse avec des pipettes Pasteur stériles (en fonction du nombre de cellules). La concentration finale des cellules devrait être de 10⁶/ml par culture.
5. Cultures selon le diagnostic préliminaire :
 - a) Cultures directes : ajouter 100 µl de solution de colcémide pour 1 à 2 heures
 - b) Cultures à court terme : incuber pendant une nuit. Ajouter 100 l de solution de colcémide pour 1 à 2 heures le lendemain matin
 - c) Action du colcémide pendant la nuit : ajouter 50 µl de solution de colcémide aussi tard que possible dans la journée. Laisser incuber à 37 °C pendant la nuit.
 - d) Culture à court terme + exposition au colcémide pendant la nuit : incuber à 37 °C pendant 24, 48 ou 72 heures. Ensuite, selon l'étape 5. c).
 - e) Cultures stimulées par des cellules B : ajouter 100 µL de PMA et/ou de PWM et incuber à 37 °C pendant 2 à 4 jours. Ajouter 100 µL de solution de colcémide et laisser incuber à 37 °C pendant la nuit.
 - f) Cultures stimulées par des cellules T : ajouter 100 µL de PHA et incuber à 37 °C pendant 72 heures. Ajouter 100 µl de solution de colcémide pendant 1 à 2 heures.

Protocole de récolte pour cellules de moelle osseuse

1. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 1 500 tr/min.
2. Retirer le surnageant.
3. Remettre le culot en suspension.
4. Ajouter 6 ml de KCL préchauffé et incuber les tubes à 37 °C pendant 20 minutes dans un bain-marie.
5. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 1 500 tr/min.
6. Retirer le surnageant.
7. Verser 5 ml de fixateur (3 méthanol : 1 acide acétique) dans le tube. Ajouter lentement quelques gouttes de fixatif et mélanger doucement. De la même manière, ajoutez un fixateur jusqu'à ce que tous les amas cellulaires se soient dissous et que la suspension cellulaire soit aussi uniforme que possible.
8. Centrifuger à 1 500 tr/min pendant 5 minutes.
9. Répétez les étapes 9 et 10 deux fois.
10. Après le dernier lavage, retirez le surnageant aussi près que possible du culot, puis remettez-le en suspension dans autant de fixateur que nécessaire pour la fabrication de lames.

Choix de la méthode (par Rooney DE et al).

Plusieurs méthodes sont disponibles et le choix de la méthode dépend fortement de la maladie à examiner. Les schémas thérapeutiques recommandés sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Diagnostic	Échantillon	Cultures minimum	Extras
CGL/CML	PB/BM	ONC, S	D, 48 h
AML (sauf APL)	BM/PB	ONC, S	24 h, 48 h
APL	BM/PB	ONC, 24 h, S	48 h
MDS	BM	ONC, S	24 h, 72 h ONC
MPD	BM	ONC, S	24 h, 72 h ONC
ALL (non B/T)	BM/PB	ONC, S	D, 24 h, 48 h
ALL (T cell)	BM/PB	ONC, S	D, 24 h, 48 h, 3 d
ALL (B cell)	BM/PB	ONC, 3d + PMA 5 d + PMA ; 2 d + PHA	D, S, 24 h, 48 h
CLL (B cell)	PB/BM	ONC, 3 d + PMA 5 d + PMA ; 2 d + PHA	3 d
CLL (T cell)	PB/BM	ONC, 3 d + PHA 3 d PMA	3 d
T-cell lymphoma	LN/BM	ONC, 3 d + PHA 3 d + PMA	3 d
B-cell lymphoma	LN/BM	ONC, 3 d + PMA 5 d + PMA	3 d
Autres maladies lymphatiques	BM	ONC, 3 d +/- PMA 5 d +/- PMA	S

APL : leucémie promyélocytaire aiguë ; MPD : trouble myéloprolifératif ; PB : sang périphérique ; BM : moelle osseuse ; LN : ganglions lymphatiques ; ONC : exposition au colcémide pendant la nuit ; S : culture synchronisée ; PHA : phytohémagglutinine ; PMA : acétate de 4-phorbol-12-myristate-13.

Remarques importantes

- Des cristaux d'oxalate de calcium peuvent parfois se former, mais ils n'ont jusqu'à présent montré aucun effet négatif sur la croissance cellulaire.
- La décongélation dans un bain-marie à 37 °C doit être évitée, car des précipités peuvent se former.

Avertissements et mesures de précautions

- Le maintien de la stérilité du produit est nécessaire à son utilisation et doit être strictement respecté par l'utilisateur.
- Ne convient pas pour une utilisation thérapeutique chez l'homme ou l'animal.
- Utilisation uniquement par du personnel qualifié et formé.
- Ne pas utiliser des bouteilles dont l'emballage a été endommagé.
- Ne pas utiliser CytogenMarrow Medium au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Les échantillons de patients sont du matériel biologique et des mesures de sécurité doivent donc être prises conformément aux dispositions locales relatives au travail avec du matériel potentiellement infectieux.
- Cytogen GmbH ne garantit pas le succès des tests de diagnostic uniquement par l'utilisation de produits Cytogen.
- Signalez les incidents graves liés à ce produit au fabricant et aux autorités compétentes.

Marquage CE

Avec CytogenMarrow, Cytogen propose un milieu marqué CE qui répond aux exigences réglementaires en matière de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, définies par la Commission européenne.

Explication des symboles

	Respecter les instructions d'utilisation		Fabricant
	<i>In vitro</i> -Méthode diagnostique		Date de fabrication
	Numéro d'article		Stérilisé par des procédés aseptiques
	Numéro de lot de fabrication, lot		Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé
	Utilisable jusqu'au		Protéger de la lumière du soleil.
	Limitation de température		

Fabricant



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

Tél. +49 2571 560180
Fax +49 2571 9219118
E-mail : info@cytogen.net
Site Web www.cytogen.net

