



MethoCult™ Express

Methylcellulose Medium with Recombinant Cytokines

FOR RAPID HEMATOPOIETIC COLONY ASSAYS OF HUMAN CELLS

REF 04447

24 x 3 mL

ENGLISH

INTENDED USE

MethoCult™ Express is intended for use in colony-forming cell (CFC) assays to detect and quantify human hematopoietic progenitors in cord blood (CB) samples after a minimum culture period of seven days. It is recommended for red blood cell (RBC) depleted CB samples, whole CB samples that have been cryopreserved and thawed, and CB mononuclear cells.

For professional *in vitro* diagnostic use only.

PRODUCT DESCRIPTION

MethoCult™ Express is optimized for the detection and counting of human hematopoietic progenitor cells after much shorter periods than the 14 - 16 days of standard CFC assays. In MethoCult™ Express, colonies containing at least 20 cells can be counted as early as after 7 days of culture. At this time, most colonies are immature and have not yet differentiated into morphologically distinguishable colony types. Therefore the colonies counted after seven days of culture give information about the total frequency of hematopoietic progenitor cells present in the sample without distinction between different progenitor types.

If MethoCult™ Express cultures are maintained for 14 - 16 days, colonies derived from erythroid progenitors (BFU-E); granulocyte/macrophage progenitors (CFU-GM, CFU-M, CFU-G); and multi-potential granulocyte, erythroid, macrophage and megakaryocyte progenitors (CFU-GEMM) can be counted.

Components include:

- Methylcellulose
- Fetal Bovine Serum
- Bovine Serum Albumin
- Cytokines, including erythropoietin (EPO)
- Supplements
- Iscove's MDM

This product is a biological reagent, and as such cannot be completely characterized or quantified.

QUALITY CONTROL

MethoCult™ methylcellulose-based media are aseptically manufactured using tightly controlled processes and extensively pre-screened components.

Each batch of MethoCult™ is sterility tested according to USP standards and Quality Control performance tested in CFC assays using human CB samples. A Certificate of Analysis is available upon request.

LIMITATIONS

Product has been CE Marked in the European Union according to the 98/79/EC *In Vitro* Diagnostic Device Directive and complies with its requirements.

Additional terms and conditions may apply.

STABILITY AND STORAGE

Store at -15 to -25°C. Product stable at -15 to -25°C until expiry date indicated on label.

Do not repeatedly freeze and thaw.

If product is received partially thawed, place immediately at -20°C.

PRECAUTIONS

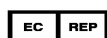
1. For professional use only.
2. This product should be handled by trained personnel observing good laboratory practices. Once human cells are combined with the product, treat as potentially biohazardous. Handling of reagents and disposal of waste should observe all local, state or national regulations.
3. This product is a potential irritant to eyes, respiratory system, and skin. This product may also be harmful if ingested. Avoid exposure through skin, eye contact, inhalation, and ingestion. May cause allergic reaction in sensitized individuals.

 STEMCELL Technologies Inc | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com



MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 1 of 20

SPECIAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Equipment

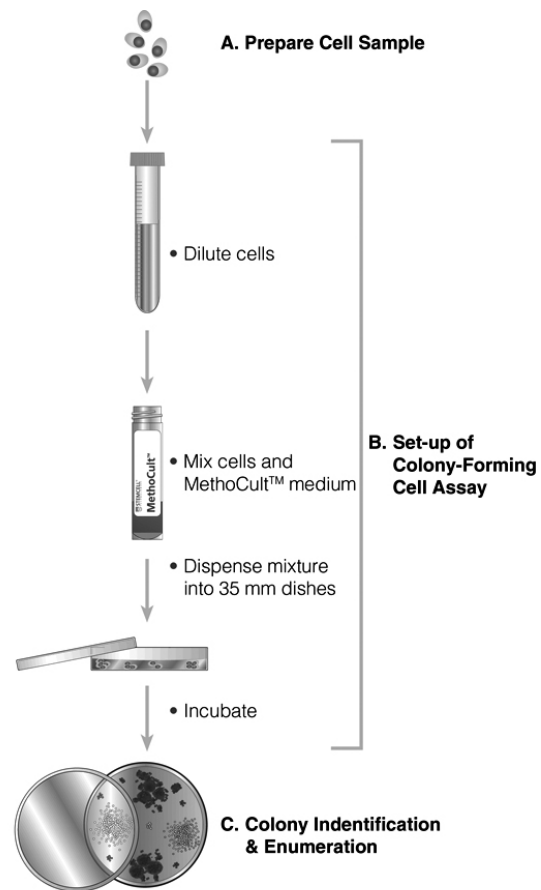
- Biohazard Safety Cabinet certified for Level II handling of biological materials. *All procedures for cell processing and set-up of CFC assays should be performed using sterile technique and universal safe handling precautions.*
- Incubator set at 37°C with 5% CO₂ in air and ≥95% humidity. *Use of water-jacket incubators with a water pan placed in the chamber is recommended.*
- Inverted Microscope. *Use of a quality inverted microscope equipped with a 10 or 12.5X eyepiece objective, 2X, 4X and 10X planar objectives and a blue filter is recommended.*
- The STEMvision™ instrument for automated imaging and scoring of hematopoietic colonies may be used in place of a microscope to score colonies in the 7-day CFC-assay. See www.stemcell.com for more details.
- Equipment for cell processing and cell counting as required.

Reagents and Materials

- MethoCult™ Cell Wash Medium (Catalog #87700)
- 16-gauge Blunt-End Needles (Catalog #28110/28120)*
- 35 mm pre-tested Culture Dishes (Catalog #27100/27150)*
- 60 mm Gridded Scoring Dish (Catalog #27500)*
- Syringes (Luer lock): 3 mL, 6 mL
- Sterile pipettes and sterile polystyrene tubes
- 100 mm disposable petri dishes
- Sterile distilled water
- Cell processing and cell counting reagents and materials as required

*Use of STEMCELL Technologies products with the indicated Catalog numbers is recommended. See Notes.

HANDLING AND DIRECTIONS FOR USE



For more detailed instructions refer to the Technical Manual "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Manual Catalog #28404), available at www.stemcell.com.

Available in English only.

A. Prepare Cell Sample

1. The human cell source and cell sample processing method used is dependent on individual laboratory requirements.
2. It is recommended that cell samples are washed and diluted in MethoCult™ Cell Wash Medium (Catalog #87700).
3. The following are examples of suitable cell processing techniques:
 - a. **Red blood cell depleted cell suspensions** can be prepared by lysis of red blood cells (RBC) using ammonium chloride solution (Catalog #07800/07850), as described in the Technical Manual (Manual Catalog #28404).
 - b. **Whole cord blood** that has been **cryopreserved** can be **thawed** according to the procedure operational in your institution. A suggested procedure is provided in the Technical Manual (Manual Catalog #28404). *Red blood cells and other mature cells (e.g. granulocytes) are sensitive to cryopreservation and will lyse, significantly reducing background in the dishes.*

- c. **Mononuclear cells** can be prepared by centrifugation over Ficoll-Paque™ PLUS or PREMIUM.

Ficoll-Paque™ is a trademark of GE Healthcare Ltd.

4. Count nucleated cells using a hemacytometer after diluting with 3% acetic acid with methylene blue (Catalog #07060) or using an automated cell counter. *Methods to assay viable cells (e.g. trypan blue (Catalog # 07050) dye exclusion) should be used for cell preparations where a decrease in cell viability may be expected (e.g. cryopreserved cells).*

B. Set-up of Colony-Forming Cell Assays

1. Thaw tubes under refrigeration (2 - 8°C) overnight or at room temperature (15 - 25°C).
2. **Dilute cells:** Prepare a 10X concentrated cell suspension (see Table 1 and Notes) of cells in MethoCult™ Cell Wash Medium (Catalog #87700). For example, prepare a sample of 5×10^5 cells/mL in MethoCult™ Cell Wash Medium for a plating concentration of 5×10^4 cells per dish.

The progenitor content and quality of individual cord blood preparations can be highly variable. Plate cells at 2 - 4 different densities to ensure sufficient cells are plated to yield approximately 25 - 120 colonies per 35 mm dish (1.1 mL culture).

3. Add 0.3 mL of cells to 3 mL of MethoCult™.
- This 1:10 v/v ratio of cells:medium gives the correct medium viscosity to ensure optimal CFC growth and morphology.*
4. Vortex tube to mix contents thoroughly and then let stand for 2 - 5 minutes to allow bubbles to rise to the top before dispensing.
5. **Dispense:** Using a 3 mL syringe attached to a 16 gauge blunt-end needle, dispense 1.1 mL of the MethoCult™ mixture containing cells into 2 (or 3) 35 mm dishes (Catalog #27100/27150). Gently tilt and rotate each dish to distribute methylcellulose evenly.
6. **Add 3 mL** of sterile water to an additional uncovered 35 mm dish. For duplicate assays, place all three dishes into a 100 mm culture dish (Catalog #27125/27127).

Always provide water dishes to maintain humidity.

7. **Incubate** at 37°C, in 5% CO₂, with ≥95% humidity for 7 days (or 14 - 16 days, if desired). Proper culture conditions are critical for optimal CFC growth. *Use of water-jacketed incubators with water pan in chamber and routine monitoring of temperature and CO₂ levels is recommended (see Notes).*

C. Colony Identification and Enumeration

Scoring Overview

Use a high-quality inverted microscope equipped with 2X, 4X and 10X planar objectives and stage holder for a 60 mm gridded dish (Catalog #27500). A blue filter will enhance the red color of hemoglobinized erythroblasts in CFU-E, BFU-E and CFU-GEMM when counting colonies at 14 - 16 days.

Scoring After 7 Days

Scan the dish on low power (2X objective, 20 - 25X magnification) to evaluate the relative distribution of colonies. Score colonies with 4X objective and count all colonies containing more than 20 cells. As most colonies are immature, scoring individual colony types (i.e. BFU-E and CFU-GM) is not recommended after only 7 days. Please refer to the Technical Manual (Manual Catalog #28404) for examples of colonies counted after 7 days of culture in MethoCult™ Express.

Scoring After 14 - 16 Days

NOTE: Cord blood-derived colonies in MethoCult™ Express can be very large after 14 days of culture and it may be difficult to accurately distinguish individual colonies in dishes plated at high cell concentrations. Plating at different cell concentrations is recommended to assess progenitor frequencies (see Table 1).

Mature BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM can be distinguished and counted using standard criteria. Refer to the Technical Manual "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Manual Catalog #28404), available at www.stemcell.com.

First, scan the dish on low power (2X objective, 20 - 25X magnification) to evaluate the relative distribution of colonies. Score BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM on low or medium power and use high power to confirm colony type as required.

COLONY DESCRIPTIONS

Scoring After 14 - 16 Days

BFU-E: Burst-forming unit-erythroid produces a colony containing >200 erythroblasts, usually present in >2 clusters.

CFU-GM: Colony-forming unit-granulocyte, macrophage produces a colony containing >40 granulocyte and macrophage cells.

CFU-G and **CFU-M:** Colonies contain >40 granulocytes and macrophages, respectively.

CFU-GEMM: Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte produces a colony containing erythroid cells as well as 20 or more granulocyte, macrophage and megakaryocyte cells.

NOTES

1. Syringes and large bore blunt-end needles should be used for accurate dispensing of viscous methylcellulose medium and to prevent needle-stick injuries.
2. Important to use petri dishes that have been pre-screened for low cell adherence because excessive cell adherence can inhibit CFC growth or interfere with colony recognition.
3. Important to routinely monitor incubator temperature, CO₂ and humidity levels to ensure proper culture conditions.
4. Fresh or cryopreserved cell samples can be used.
5. Suitable cell processing procedures must be established in each laboratory. For example, fresh cord blood samples depleted of RBC by sedimentation using HetaSep™ (Catalog #07806/07906) may contain residual RBC, which can interfere with colony detection and identification.
6. Automated identification and scoring of colonies after 7 days of culture can be performed using STEMvision™ with MethoCult™ Express algorithm (for 7-day CFC-assays). For use with STEMvision™, assays need to be set up in SmartDish™ cultureware instead of 35 mm dishes. Visit www.stemcell.com for more details.
7. For additional assistance on hematopoietic colony recognition and enumeration, refer to the references listed below and the Technical Manual "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Manual Catalog #28404).

Available in English only.

Table 1. Recommended Cell Plating Concentrations

CELL SOURCE	CELLS PER 35 mm DISH
CB, RBC depleted	2×10^4 - 5×10^4
Whole CB, cryopreserved	3×10^4 - 5×10^4
CB mononuclear cells	1×10^4 - 2×10^4

REFERENCES

1. Eaves CJ: Assays of hematopoietic progenitor cells. Williams Hematology, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Collier, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995.
2. Eaves C and Lambie K: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. STEMCELL Technologies, Inc., 1995. *Available in English only (Catalog #28700).*
3. Nissen-Druey C, Tichelli A and Meyer-Monard S: Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. S. Karger Medical and Scientific Publishers, 2005. Reprint of Acta Haematol 113 (1): 5-96, 2005. *Available in English only (Catalog #28760).*
4. Atlas of Hematopoietic Colonies from Cord Blood. STEMCELL Technologies, Catalog # 29940, www.stemcell.com. *Available in English only.*

TECHNICAL ASSISTANCE

For technical support please contact us by email at info@stemcell.com or call **+1.604.877.0713**. For more information please visit www.stemcell.com.

EC REP MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Catalog or reference number	LOT Batch code	 Use by: MM-YYYY
 Caution, consult accompanying documents	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device	 For storage within temperature limits
STERILE A Aseptic Processing	 Manufacturers identification (name & address)	EC REP Authorized EC representative in the European Community
 CE Mark		

 **STEMCELL Technologies Inc** | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com

EC REP

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



IVD

#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 4 of 20

MethoCult™ Express**Medium Méthylcellulose avec des Cytokines Recombinantes**

POUR DES TESTS RAPIDES DE COLONIE HÉMATOPOÏÉTIQUE DE CELLULES HUMAINES

REF 04447**24 x 3 mL****UTILISATION CONSEILLÉE**

MethoCult™ Express est destiné aux tests des « colony-forming cell » (CFC) qui permettent la détection et la quantification des progéniteurs hématopoïétiques humains dans les échantillons de sang du cordon ombilical (CB), après une période de culture minimale de sept jours. Cela est recommandé pour les échantillons de sang de cordon ombilical déplété des globules rouges (RBC), les échantillons de sang du cordon ombilical total ayant été cryoconservés et décongelés, ainsi que les cellules mononucléées du sang de cordon ombilical.

Réservé uniquement à un usage de diagnostic *in vitro* professionnel.

COMPOSITION

MethoCult™ Express est optimisé pour la détection et la quantification des cellules progénitrices hématopoïétiques dans un délai plus court que le test CFC standard en MethoCult allant de 14 à 16 jours. MethoCult™ Express permet de quantifier les colonies contenant un minimum de 20 cellules à partir de 7 jours de culture. À ce stade, la plupart des colonies sont immatures et ne se sont pas encore différenciées en des types de colonies morphologiquement reconnaissables. Ainsi, les colonies quantifiées après sept jours de culture apportent des informations sur la fréquence totale des cellules progénitrices hématopoïétiques présentes dans l'échantillon, sans distinction entre les différents types de progéniteurs.

Si les cultures de MethoCult™ Express sont conservées pendant 14 à 16 jours, il est possible de quantifier les colonies dérivées des progéniteurs érythroïdes (BFU-E); des progéniteurs granulocytes/macrophages (CFU-GM, CFU-M, CFUG); et des progéniteurs granulocytes, érythroïdes, macrophages et mégacaryocytes multipotents (CFUGEMM).

Le MethoCult™ 04437 contient:

- Méthylcellulose
- Sérum bovin fœtal
- Sérumbalbumine bovine
- Cytokines, y compris érythropoïétines (EPO)
- Suppléments
- Iscove's MDM

Ce produit est un réactif biologique et ne peut donc pas être totalement caractérisé et quantifié.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les milieux de méthylcellulose MethoCult™ sont préparés aseptiquement grâce à des procédés strictement contrôlés et avec des composants prétestés.

La stérilité de chaque lot de MethoCult™ est vérifiée selon les normes USP et les performances sont évaluées sur les tests de CFC à partir de CB humains. Un certificat d'analyse est disponible sur demande.

GARANTIES ET LIMITES

Ce produit a reçu le marquage CE dans l'Union Européenne conformément à la Directive 98/79/EC relative aux Dispositifs Médicaux de Diagnostic *In Vitro* et se conforme à ses obligations.

Des conditions supplémentaires peuvent s'appliquer.

CONSERVATION ET STABILITÉ

Conserver entre -15 °C et -25 °C. Produit stable entre -15 et 25 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

Ne pas répéter les cycles de congélation et de décongélation.

Si le produit est partiellement décongelé à sa réception, le placer immédiatement à -20 °C.

PRÉCAUTIONS

1. Utilisation strictement réservée à des professionnels.
2. Ce produit doit être manipulé par des personnes formées, observant les règles des bonnes pratiques de laboratoire. Le produit doit être considéré comme potentiellement dangereux dès que des cellules humaines y ont été ajoutées. La manipulation des réactifs et l'élimination des déchets doivent suivre la réglementation en vigueur localement ou au niveau national.
3. Ce produit peut être irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau. Ce produit peut être dangereux s'il est ingéré. Éviter toute exposition de la peau, tout contact avec les yeux, l'inhalation ou l'ingestion. Le produit peut engendrer des réactions allergiques chez les sujets sensibilisés.

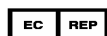


STEMCELL Technologies Inc | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com



MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 5 of 20

MATERIEL SPECIAL NÉCESSAIRE NON FOURNI

Équipement

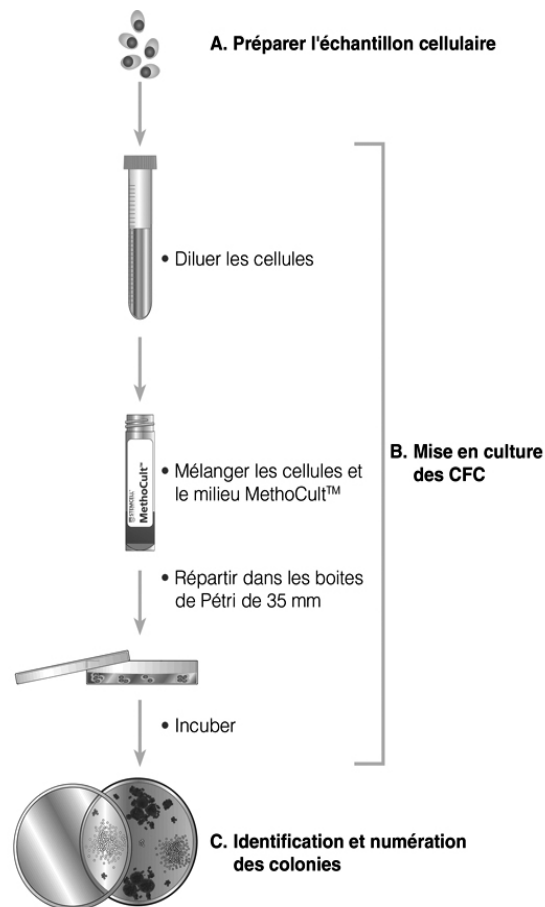
- Hotte à flux laminaire certifiée pour la manipulation des prélèvements biologiques de niveau II. *Toutes les procédures de préparation et de mises en culture des cellules doivent être réalisées en utilisant une technique stérile et avec toutes les précautions d'usage.*
- Incubateur à CO₂ réglé à 37 °C, 5% CO₂ dans l'air et une humidité ≥ à 95 %. *L'utilisation d'incubateurs à jaquette d'eau avec un récipient rempli d'eau placé dans la chambre est recommandée.*
- Microscope inversé. *Il est recommandé d'utiliser un microscope de qualité, équipé d'oculaires de grossissement 10X ou 12,5X et d'objectifs plans de grossissement 2X, 4X et 10X ainsi que d'un filtre bleu.*
- L'instrument STEMvision™ pour l'imagerie et la quantification automatiques des colonies hématopoïétiques peut être utilisé à la place d'un microscope pour quantifier les colonies présentes dans le test de cellules formant des colonies à 7 jours. Consulter le site www.stemcell.com pour de plus amples informations.
- Équipement pour la manipulation des cellules et leur comptage.

Réactifs et matériels

- Milieu MethoCult™ Cell Wash (Référence N° 87700)
- Aiguilles à bout franc de 16G (Référence N° 28110/28120)*
- Boîtes de Pétri prétestées de 35 mm (Référence N° 27100/27150)*
- Boîtes quadrillées de comptage de 60 mm (Référence N° 27500)*
- Seringues (Luer lock) : 3 mL, 6 mL
- Pipettes stériles et tubes polystyrène stériles
- Boîtes de Pétri jetables de 100 mm
- Eau distillée stérile
- Réactifs et matériels destinés à la manipulation des cellules et leur comptage.

*L'utilisation des produits STEMCELL Technologies qui sont suivis d'une référence catalogue est recommandée. Voir Notes.

MANIPULATION ET MODE D'EMPLOI



Pour obtenir des instructions supplémentaires, se reporter au manuel technique « Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™ » (Tests de cellules humaines formant des colonies avec MethoCult™) (Référence du manuel N° 28404), disponible sur le site www.stemcell.com.

Disponible en anglais uniquement.

A. Préparation de l'échantillon cellulaire

1. L'origine des cellules et la méthode de préparation varient selon les impératifs de chaque laboratoire.
2. Il est recommandé de laver et de diluer les cellules avec le milieu MethoCult™ Cell Wash (Référence N° 87700).
3. Les procédures ci-dessous sont particulièrement adaptées à la préparation des cellules:
 - a. **Les suspensions cellulaires déplétées des globules rouges** peuvent être préparées par lyse de globules rouges (RBC) avec une solution de chlorure d'ammonium (Référence N° 07800/07850), comme indiqué dans le manuel technique (Référence du manuel N° 28404).
 - b. **Le sang total de cordon ombilical** ayant été **cryoconservé** peut être **décongelé** suivant la procédure en place dans votre institut. Une suggestion de procédure est disponible dans le manuel technique (Référence du manuel N° 28404). *Les globules rouges et les autres*

cellules matures (par ex. : les granulocytes) réagissent à la cryoconservation et se lysent, réduisant considérablement le contenu des boîtes.

- c. **Les cellules mononucléées** peuvent être préparées par centrifugation via Ficoll-Paque™ PLUS ou PREMIUM.

Ficoll-Paque™ est une marque déposée de GE Healthcare Limited.

4. Compter les cellules nucléées à l'aide d'un hématimètre au bleu trypan (Référence N° 07060), dilué à l'acide acétique à 3 % ou à l'aide d'un compteur automatique de cellules. Les techniques permettant d'évaluer le nombre de cellules viables (par ex. : l'exclusion au bleu trypan [Référence N° 07050]) doivent être utilisées lorsqu'une diminution de la viabilité est possible pour une préparation cellulaire (par ex. : les cellules cryoconservées).

B. Mise en culture des CFC humaines

1. Décongeler complètement les tubes de MethoCult™ à froid (2 à 8 °C) pendant une nuit ou à température ambiante (15 à 25 °C).

2. **Diluer les cellules:** Préparer une suspension cellulaire 10X concentrée (voir Tableau 1 et Notes) dans le MethoCult™ Cell Wash Medium (Référence N° 87700). Ex: préparer une suspension à 5×10^5 cellules / mL pour une concentration finale d'ensemencement de 5×10^4 cellules par boîte de Pétri.

Le contenu en progéniteurs et la qualité des préparations individuelles de sang de cordon ombilical peuvent varier considérablement. Ensemencer 2 à 4 différentes concentrations cellulaires afin de s'assurer qu'un nombre de cellules suffisant a été mis en culture afin d'obtenir un rendement de 25 à 120 colonies par boîte de 35 mm (culture de 1,1 mL).

3. Ajouter 0,3 mL of suspension cellulaire à 3 mL de MethoCult™.

Ce ratio de 1 volume de cellules pour 10 volumes de milieu donnera une viscosité correcte pour une croissance et une morphologie optimale des CFC.

4. Centrifuger le tube pour mélanger parfaitement, puis laisser reposer 2 à 5 minutes jusqu'à disparition des bulles avant de procéder à la mise en culture.

5. **Répartition :** À l'aide d'une seringue de 3 mL dotée d'une aiguille à bout franc de 16G (1,8 mm), répartir 1,1 mL du mélange cellules et MethoCult™ dans chacune des 2 ou 3 boîtes de 35 mm (Référence N° 27100/27150). Incliner délicatement la boîte afin de répartir uniformément toute la méthylcellulose.

6. **Placer 3 mL** d'eau stérile dans une boîte 35 mm, ne pas mettre de couvercle. Pour les cultures en double, placer les 3 boîtes dans une boîte de culture de 100 mm.

Il est très important d'ajouter des boîtes contenant de l'eau pour assurer une bonne humidité

7. **Incuber** à 37 °C, 5 % CO₂, avec une humidité ≥95 % pendant 7 jours (ou 14 à 16 jours au besoin). *Il est recommandé d'utiliser des incubateurs à jaquette d'eau avec un récipient rempli d'eau placé dans la chambre et de vérifier régulièrement la température et le niveau de CO₂. Voir Notes.*

C. Identification et numération des colonies

Numération

Utiliser un microscope inversé de qualité équipé d'objectifs plans 2X, 4X et 10X ainsi que d'une platine porte-objet pour boîte quadrillée de 60 mm (Référence N° 27500). Un filtre bleu amplifiera la couleur des érythroblastes contenant de l'hémoglobine dans les colonies CFU-E, BFU-E et CFU-GEMM lors de leur quantification entre 14 et 16 jours.

Numération après 7 jours

Scanner d'abord la boîte au faible grossissement (objectif 2X, grossissement 20 à 25X) pour évaluer la répartition des colonies. Compter les colonies avec un objectif 4X et quantifier toutes les colonies contenant plus de 20 cellules. Tant que la plupart des colonies sont immatures, la quantification des types de colonie individuelle (par ex.: BFU-E et CFU-GM) est déconseillée après seulement 7 jours. Se reporter au manuel technique (Référence du manuel N° 28404) pour consulter des exemples de colonies comptées après 7 jours de culture dans MethoCult™ Express.

Numération après 14 à 16 jours

NOTE : Les colonies dérivées du sang de cordon ombilical dans MethoCult™ Express peuvent proliférer après 14 jours de culture et il peut s'avérer difficile de distinguer précisément les colonies individuelles dans les boîtes ensemencées à des concentrations cellulaires élevées. L'ensemencement à différentes concentrations cellulaires est recommandé pour contrôler la fréquence du progéniteur (voir Tableau 1).

Il est possible de reconnaître les colonies matures BFU-E, CFU-GM et CFU-GEMM et de les quantifier à l'aide de critères standard. Consulter le manuel technique « Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™ » (Tests de cellules humaines formant des colonies avec MethoCult™) (Référence du manuel N° 28404), disponible sur le site www.stemcell.com.

Scanner d'abord la boîte au faible grossissement (objectif 2X, grossissement 20 à 25X) pour évaluer la répartition des colonies. Puis compter ensuite les colonies BFU-E, CFU-GM et CFU-GEMM avec l'objectif au faible ou moyen grossissement. Si nécessaire, utiliser le fort grossissement pour confirmer le type d'une colonie.

DESCRIPTION DES COLONIES

Quantification après 14 à 16 jours

BFU-E: La « Burst-forming unit-erythroid » produit une colonie contenant plus de 200 érythroblastes, généralement en 2 amas minimum.

CFU-GM: La « Colony-forming unit-granulocyte, macrophage » donne une colonie comprenant plus de 40 granulocytes et macrophages.

CFU-G et CFU-M: Les colonies contiennent respectivement >40 granulocytes et macrophages.

CFU-GEMM: La « Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte » produit une colonie contenant des cellules érythroïdes ainsi que 20 ou plus granulocytes, macrophages et des mégakaryocytes.

NOTES

1. Des seringues et des aiguilles de large diamètre et émoussées doivent être utilisées pour permettre de distribuer des volumes précis de méthylcellulose visqueuse et pour éviter tout risque de blessure.
2. Il est important d'utiliser des boîtes de Pétri qui ont été sélectionnées pour leur faible adhérence cellulaire car une adhérence excessive peut inhiber la croissance des CFC ou gêner l'identification des colonies.
3. Il est important de vérifier régulièrement la température, le taux de CO₂ et l'humidité de l'incubateur afin d'assurer des conditions de culture optimales.
4. Il est possible d'utiliser des échantillons de cellules fraîches ou congelées.
5. Les protocoles de préparation des cellules doivent être optimisés par chaque laboratoire. Par exemple, des échantillons de sang de cordon ombilical frais déplétés des globules rouges par sédimentation via HetaSep™ (Référence N° 07806/07906) peuvent contenir des globules rouges résiduels pouvant gêner la détection et l'identification des colonies.
6. Il est possible de procéder à l'identification et à la quantification automatiques des colonies après 7 jours de culture via STEMvision™, avec l'algorithme de MethoCult™ Express (pour des tests CFC à 7 jours). Pour une utilisation avec STEMvision™, les cultures doivent être préparées dans une boîte de culture SmartDish™ au lieu des boîtes de 35 mm. Consulter le site www.stemcell.com pour de plus amples informations.
7. Pour plus d'informations sur la numération et l'identification des colonies hématopoïétiques, se référer à la bibliographie citée ci-après et au Technical Manual for Human Colony-Forming Cell Assays (Référence N° 28404).

Disponible en anglais uniquement.

Tableau 1. Concentrations d'ensemencement recommandées

SOURCE DE L'ÉCHANTILLON	CELLULES PAR BOÎTE DE 35 MM
Sang de cordon ombilical, déplété des globules rouges	2×10^4 - 5×10^4
Sang de cordon ombilical entier, cryoconservé	3×10^4 - 5×10^4
Cellules mononucléées du sang de cordon ombilical	1×10^4 - 2×10^4

RÉFÉRENCES

1. Eaves CJ: Assays of hematopoietic progenitor cells. Williams Hematology, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Collier, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995.
2. Eaves C and Lambie K: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. STEMCELL Technologies, Inc., 1995. *Disponible en anglais uniquement (Référence N° 28700).*
3. Nissen-Druey C, Tichelli A and Meyer-Monard S: Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. S. Karger Medical and Scientific Publishers, 2005. Reprint of Acta Haematol 113 (1): 5-96, 2005. *Disponible en anglais uniquement (Référence N° 28760).*
4. Atlas of Hematopoietic Colonies from Cord Blood (Atlas des colonies hématopoïétiques du sang de cordon ombilical). STEMCELL Technologies, Référence N° 29940, www.stemcell.com. *Disponible en anglais uniquement.*

ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour toute assistance technique, veuillez prendre contact avec nous par courriel à info@stemcell.com ou d'appeler le **+1.604.877.0713**. Pour plus d'informations: www.stemcell.com.

EC REP MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Référence du catalogue	LOT Numéro de lot	 Utiliser jusque: MM-YYYY
 Attention: voir notice d'instructions	IVD Dispositif médical de diagnostic In vitro	 Limites de températures
STERILE A Méthode de stérilisation utilisant des techniques d'asepsie	 Fabriquant	EC REP Représentant autorisé dans la Communauté européenne
 Marquage CE		

 **STEMCELL Technologies Inc** | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com

EC REP

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



IVD

#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 8 of 20

MethoCult™ Express

Medio de Metilcelulosa con Citoquinas Recombinantes

PARA ENSAYOS RÁPIDOS DE COLONIAS HEMATOPOYÉTICAS DE CÉLULAS HUMANAS

REF 04447

24 x 3 mL

USO PREVISTO

MethoCult™ Express está destinado para su uso en ensayos de células formadoras de colonias (CFC) para detectar y cuantificar células progenitoras hematopoyéticas humanas en muestras de sangre del cordón umbilical (SCU) después de un período de cultivo mínimo de siete días. El producto está recomendado para muestras de SCU sin eritrocitos, muestras de SCU total que han sido criopreservadas y descongeladas, y células mononucleares de SCU.

Destinado únicamente para profesionales del diagnóstico *in vitro*.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

MethoCult™ Express está optimizado para la detección y cuantificación de células progenitoras hematopoyéticas humanas en periodos mucho más cortos que los 14-16 días de los ensayos de CFC estándar. En MethoCult™ Express, las colonias que contengan al menos 20 células se pueden contar en tan solo 7 días tras el cultivo. En este punto, la mayoría de las colonias son inmaduras y aún no se han diferenciado en los distintos tipos de colonias morfológicamente distinguibles. Por lo tanto, las colonias que se cuentan a los siete días del cultivo proporcionan información acerca de la frecuencia total de las células progenitoras hematopoyéticas presentes en la muestra sin distinción entre los diferentes tipos de progenitores.

Si los cultivos de MethoCult™ Express se mantienen durante 14-16 días, se pueden contar las colonias derivadas de las células progenitoras eritroides (BFU-E), las progenitoras granulocíticas-macrófagos (CFU-GM, CFU-M, CFUG) y las progenitoras granulocíticas, eritroides, macrófagos y megacariocitos multipotenciales (CFUGEMM).

Los componentes incluyen:

- Metilcelulosa
- Suero Fetal Bovino
- Albúmina sérica Bovina
- Citoquinas, incluida la eritropoyetina (EPO)
- Complementos
- Iscove's MDM

Este producto es un reactivo biológico, y como tal, no puede ser caracterizado o cuantificado completamente.

CONTROL DE CALIDAD

Los medios MethoCult™ basados en metilcelulosa son fabricados asépticamente usando procesos estrictamente controlados y componentes previamente testados de forma exhaustiva.

La esterilidad de cada lote de MethoCult™ es comprobada de acuerdo con las normas USP. El control de calidad de su funcionamiento se realiza con ensayos de CFC usando muestras humanas de SCU. Está disponible un certificado de análisis bajo solicitud.

LIMITACIONES

El producto ha recibido la aprobación del Marcado CE en la Unión Europea con conformidad de la Directiva 98/79/CE de Dispositivos de Diagnóstico *In Vitro* y cumple con sus requisitos.

Podrán aplicarse términos y condiciones adicionales.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacenar entre -15 °C y -25 °C. El producto permanece estable a una temperatura de entre -15 y -25 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

No congelar y descongelar repetidamente.

Si el producto se recibe parcialmente descongelado, colóquelo inmediatamente a una temperatura de -20 °C.

PRECAUCIONES

1. Sólo para usuarios profesionales.
2. Este producto deberá ser manipulado por personal formado y respetando las buenas prácticas de laboratorio. Una vez que el producto se combina con células humanas, deberá ser tratado como material con riesgo de peligro biológico. La manipulación de los reactivos y la eliminación de los residuos deberán realizarse de acuerdo con las normas locales, estatales o nacionales.
3. Este producto es potencialmente irritante para ojos, sistema respiratorio y piel. Este producto puede también ser peligroso si es ingerido. Debe evitarse la exposición al producto a través de la piel, el contacto con los ojos, su inhalación e ingestión. Puede provocar reacciones alérgicas en individuos sensibilizados.

MATERIALES ESPECIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Equipo

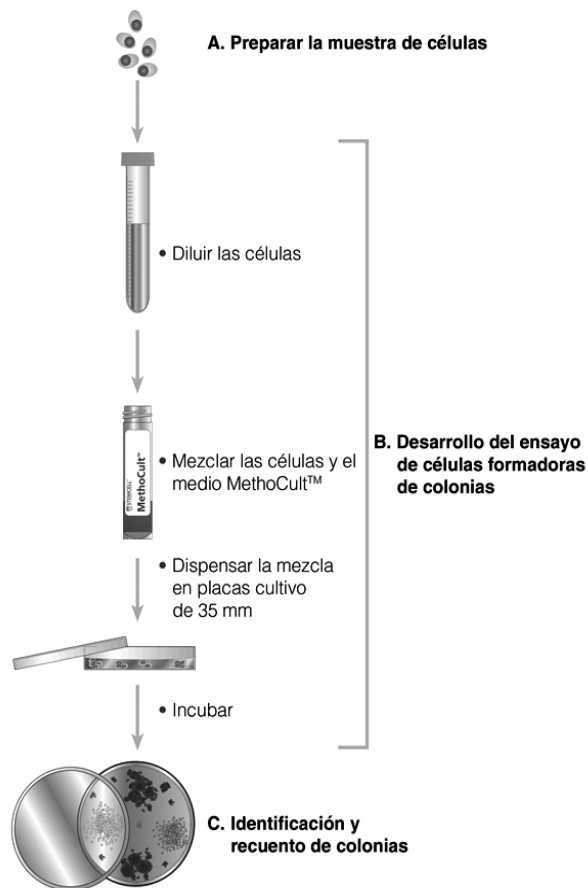
- Cabina de bioseguridad certificada para manipulación de materiales biológicos Nivel II. *Todos los procedimientos para procesamiento de células y desarrollo de ensayos de CFC deberán ser llevados a cabo usando técnicas estériles y precauciones universales de bioseguridad.*
- Incubadora a 37 °C con atmósfera de 5% CO₂ y ≥95% de humedad. *Se recomienda el uso de incubadoras que contengan un recipiente con agua en su interior.*
- Microscopio invertido. *Se recomienda el uso de un microscopio invertido de calidad, equipado con un objetivo ocular de 10 ó 12,5X, objetivos planos de 2X, 4X y 10X y filtro azul.*
- El instrumental STEMvision™ para la obtención automática de imágenes y cuantificación de colonias hematopoyéticas se puede usar en lugar de un microscopio para cuantificar colonias en el ensayo de CFC a los 7 días. Visite www.stemcell.com para más información.
- Equipos para procesamiento de células y recuento celular según sea necesario.

Materiales y Reactivos

- Medio para lavado de células MethoCult™ (n.º de catálogo 87700)
- Agujas de punta roma, de calibre 16 (n.º de catálogo 28110/28120)*
- Placas de cultivo de 35 mm (previamente comprobadas) (n.º de catálogo 27100/27150)*
- Placa cuadrículada para Recuento de 60 mm (n.º de catálogo 27500)*
- Jeringas Luer lock: 3 mL, 6 mL
- Pipetas estériles y tubos de poliestireno estériles
- Placas de Petri desechables de 100 mm
- Agua destilada estéril
- Reactivos y materiales para procesamiento y recuento de células, según sea necesario

*Se recomienda el uso de productos de STEMCELL Technologies con los números de catálogo que se indican. Ver Notas.

MANIPULACIÓN E INSTRUCCIONES DE USO



Para obtener instrucciones más detalladas, consulte el manual técnico "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Ensayos de formación de colonias humanas utilizando MethoCult™) (n.º de catálogo del manual 28404), disponible en www.stemcell.com.

Disponible solo en inglés.

A. Preparación de la muestra de células

1. La procedencia de las células humanas y el método de procesamiento de la muestra dependen de las necesidades de cada laboratorio.
2. Se recomienda que las muestras celulares sean lavadas y diluidas con el medio de lavado de células MethoCult™ (n.º de catálogo 87700).
3. A continuación se exponen ejemplos de técnicas apropiadas de procesamiento celular:
 - a. **Las suspensiones de las células sin eritrocitos** se pueden preparar mediante la lisis de eritrocitos usando una solución de cloruro de amonio (n.º de catálogo 07800/07850), tal como se describe en el manual técnico (n.º de catálogo del manual 28404).
 - b. **La sangre del cordón umbilical completa** que se haya **crioconservado** se puede **descongelar** siguiendo el

procedimiento operacional de su centro. En el Manual técnico (n.º de catálogo del manual 28404) se proporciona una sugerencia de procedimiento. *Los eritrocitos y otras células maduras (p. ej., granulocitos) son sensibles a la crioconservación y se lisan, lo que reducirá significativamente el fondo en las placas.*

- c. **Las células mononucleares** se pueden preparar mediante centrifugación en una máquina Ficoll-Paque™ PLUS o PREMIUM.

Ficoll-Paque™ es una marca comercial de GE Healthcare Limited.

4. Cuento las células nucleadas usando un hemocitómetro después de diluirlas con ácido acético al 3% junto con azul de metileno (n.º de catálogo 07060) o utilice un contador automático de células. *Se deben emplear métodos para analizar las células viables (p. ej. exclusión mediante tinte azul de tripano [n.º de catálogo 07050]) para las preparaciones de células en caso de que se prevea una menor viabilidad de las células (p. ej., células crioconservadas).*

B. Desarrollo del ensayo de células formadoras de Colonias

1. Descongelar tubos de MethoCult™ durante la noche en el refrigerador (2-8 °C) o a temperatura ambiente (15-25 °C).
2. **Diluir las células:** Preparar una suspensión celular concentrada 10X (ver Tabla 1 y Notas) en MethoCult™ Cell Wash Medium (n.º de catálogo 87700). Por ejemplo, preparar una muestra de 5×10^5 células por mL para sembrar 5×10^4 células en cada placa.

El contenido de células progenitoras y la calidad de cada preparación de sangre del cordón umbilical podrían variar sustancialmente. Coloque las células en 2-4 densidades diferentes para asegurarse de que se preparan suficientes células para obtener aproximadamente 25-120 colonias por placa de 35 mm (cultivo de 1,1 mL).

3. Agregar 0,3 mL de células a 3 mL de MethoCult™.
- Esta relación 1:10 v/v de células: medio proporciona una viscosidad apropiada a dicho medio para asegurar un crecimiento y morfología óptimos de las CFC.*
4. Agite bien el tubo para mezclar completamente el contenido y déjelo reposar durante 2-5 minutos para que las burbujas suban a la superficie antes de la dispensación.
5. **Dispensación:** Utilizando una jeringa de 3 mL con una aguja de punta roma de 16 G, dispense 1,1 mL de la mezcla de MethoCult™ que contiene células en 2 (o 3) placas de 35 mm (n.º de catálogo 27100/27150). Inclinar y girar suavemente cada placa para distribuir la metilcelulosa de forma homogénea.
6. **Agregar 3 mL** de agua estéril a una placa de 35 mm a la que ha quitado la cubierta. En los ensayos por duplicado, colocar las tres placas en una placa de cultivo de 100 mm (n.º de catálogo 27125/27127).

Usar siempre placas hidratadas para mantener la humedad.

7. **Incube** a 37 °C en 5% CO₂ con un ≥95% de humedad durante 7 días (o 14-16 días, si así lo desea). Para lograr un crecimiento óptimo de las CFC es esencial mantener unas condiciones de cultivo adecuadas. *Se recomienda el uso de incubadoras con camisa de agua, con una bandeja con agua*

en la cámara. Se recomienda también el monitoreo continuo de la temperatura y los niveles de CO₂ (ver Notas).

C. Identificación y Recuento de Colonias

Descripción del recuento

Utilice un microscopio invertido de alta calidad equipado con objetivos planares de 2X, 4X y 10X y un soporte para una placa cuadrículada de 60 mm (n.º de catálogo 27500). Un filtro azul mejorará el color rojo de los eritroblastos hemoglobinizados en CFU-E, BFU-E y CFU-GEMM cuando se cuenten colonias a los 14-16 días.

Cuantificación después de 7 días

Coloque la placa a una potencia baja (objetivo de 2X, aumento de 20-25X) para evaluar la distribución relativa de las colonias. Cuantifique las colonias con un objetivo de 4X y cuente todas las colonias que contengan más de 20 células. Puesto que la mayoría de las colonias son inmaduras, la cuantificación de tipos de colonias individuales (es decir, BFU-E y CFU-GM) no se recomienda después de sólo 7 días. Consulte el Manual técnico (n.º de catálogo del manual 28404) para obtener ejemplos de colonias cuantificadas después de 7 días de cultivo en MethoCult™ Express.

Cuantificación después de 14-16 días

NOTA: Las colonias derivadas de sangre del cordón umbilical en MethoCult™ Express pueden ser muy numerosas después de 14 días de cultivo y podría ser difícil distinguir de forma precisa colonias individuales en placas preparadas con concentraciones elevadas de células. Se recomienda la preparación de las muestras en diferentes concentraciones de células para evaluar las frecuencias de células progenitoras (véase la Tabla 1).

Las colonias maduras de BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM se pueden distinguir y contar usando criterios estándares. Consulte el manual técnico "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Ensayos de formación de colonias humanas utilizando MethoCult™) (n.º de catálogo del manual 28404), disponible en www.stemcell.com.

En primer lugar, coloque la placa a una potencia baja (objetivo de 2X, aumento de 20-25X) para evaluar la distribución relativa de las colonias. Cuantifique las colonias de BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM a una potencia baja o media y utilice una potencia alta para confirmar el tipo de colonia según necesite.

DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS

Cuantificación después de 14-16 días

BFU-E: La unidad formadora de colonias explosivas de la serie eritroide produce una colonia que contiene >200 eritroblastos, generalmente repartidos en >2 agregados.

CFU-GM: La unidad productora de colonias de la serie granulocito-macrófago produce una colonia que contiene >40 granulocitos y macrófagos.

CFU-G y CFU-M: Colonias que contienen >40 granulocitos y macrófagos, respectivamente.

CFU-GEMM: La unidad formadora de colonias de granulocitos, de la serie eritroide, macrófagos, y megacariocitos produce una colonia que contiene células eritroides, así como 20 o más granulocitos, macrófagos y megacariocitos.

NOTAS

1. Para dispensar con precisión el medio viscoso de metilcelulosa deberán usarse jeringas y agujas de gran calibre de punta roma, que además evitarán la producción de heridas por pinchazo con las agujas.
2. Es importante usar placas de Petri cuya baja adherencia celular haya sido previamente comprobada porque una excesiva adherencia celular puede inhibir el crecimiento de las CFC o dificultar el reconocimiento de las colonias.
3. Es importante monitorear continuamente la temperatura y los niveles de CO₂ y humedad de la incubadora para asegurar unas condiciones de cultivo apropiadas.
4. Pueden usarse muestras de células frescas o congeladas.
5. Cada laboratorio deberá establecer los procedimientos de procesamiento de células adecuados. Por ejemplo, las muestras de sangre fresca del cordón umbilical que hayan sido privadas de eritrocitos mediante sedimentación utilizando HetaSep™ (n.º de catálogo 07806/07906) pueden contener eritrocitos residuales, que pueden interferir en la detección e identificación de colonias.
6. La identificación y cuantificación automatizadas de las colonias después de 7 días de cultivo se puede realizar mediante un algoritmo de STEMvision™ con MethoCult™ Express (para ensayos de CFC a los 7 días). Para poder utilizarse con STEMvision™, los ensayos se deben preparar con un instrumental de cultivos SmartDish™ en lugar de en placas de 35 mm. Visite www.stemcell.com para obtener más información.
7. Si desea obtener más información acerca del reconocimiento y la cuantificación de las colonias hematopoyéticas, consulte la bibliografía que se muestra a continuación, así como Technical Manual for Human Colony-Forming Cell Assays (n.º de catálogo del manual 28404).

Disponible solo en inglés.

Tabla 1. Concentraciones celulares recomendadas para sembrar

PROCEDENCIA DE LAS CÉLULAS	CÉLULAS POR PLACA DE 35 MM
SCU sin eritrocitos	2×10^4 - 5×10^4
SCU completa, crioconservada	3×10^4 - 5×10^4
Células mononucleares de SCU	1×10^4 - 2×10^4

BIBLIOGRAFÍA

1. Eaves CJ: Assays of hematopoietic progenitor cells. Williams Hematology, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Collier, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995.
2. Eaves C and Lambie K: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. STEMCELL Technologies, Inc., 1995. *Disponible solo en inglés (n.º de catálogo 28700).*
3. Nissen-Druey C, Tichelli A and Meyer-Monard S: Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. S. Karger Medical and Scientific Publishers, 2005. Reprint of Acta Haematol 113 (1): 5-96, 2005. *Disponible solo en inglés (n.º de catálogo 28760).*
4. Atlas of Hematopoietic Colonies from Cord Blood (Atlas de colonias hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical). STEMCELL Technologies, n.º de catálogo del manual 29940, www.stemcell.com. *Disponible solo en inglés.*

ASISTENCIA TÉCNICA

Para solicitar asistencia técnica, le rogamos se ponga en contacto con nosotros por e-mail a info@stemcell.com o llame al **+1.604.877.0713**. Para obtener más información, por favor visite www.stemcell.com.

EC REP MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Número de catálogo o de referencia	LOT Código de lote	 Usar hasta: MM-AAAA
 Precaución, consultar los documentos adjuntos	IVD Equipo médico para diagnóstico in vitro	 Conservar dentro del rango de temperaturas
STERILE A Procesamiento aséptico	 Identificación del fabricante (nombre y domicilio)	EC REP Representante autorizado para la Comunidad Europea
 Marca CE		

 **STEMCELL Technologies Inc** | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com

EC REP

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



IVD

#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 12 of 20

MethoCult™ Express**Media Metilcellulosa con Citochine Ricombinanti**

DA UTILIZZARE PER SAGGI RAPIDI DI COLONIE EMATOPOIETICHE DI CELLULE UMANE

REF 04447

24 x 3 mL

UTILIZZO

MethoCult™ Express è utilizzato nei saggi clonogenici (CFC) per determinare e quantificare i progenitori ematopoietici umani in campioni di sangue cordonale (SC) dopo un periodo di coltura minimo di sette giorni. È consigliato per campioni di SC purificato da globuli rossi, per campioni di SC intero che siano stati crioconservati e scongelati, e per cellule mononucleari di SC.

Esclusivamente per utilizzo diagnostico professionale *in vitro*.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

MethoCult™ Express è ottimizzato per la ricerca e la conta di cellule progenitrici ematopoietiche umane coltivate per periodi più brevi dei 14 - 16 giorni tipici del saggio clonogenico standard. Con il MethoCult™ Express, le colonie contenenti almeno 20 cellule possono essere contate dopo 7 giorni di coltura. In questo periodo molte colonie sono immature e non si sono ancora differenziate in tipi di colonie morfologicamente riconoscibili. Quindi, le colonie contate dopo 7 giorni di coltura forniscono informazioni sulla frequenza totale delle cellule progenitrici ematopoietiche presenti nel campione senza distinzione tra i diversi tipi di progenitori.

Se le colture sono coltivate con il MethoCult™ Express per 14 - 16 giorni, le colonie che si formano che derivano dai progenitori eritroidi (BFU-E), dai progenitori granulocitici/macrofagi (CFU-GM, CFU-M, CFU-G) e i progenitori dei megacariociti, dei macrofagi, degli eritroidi e dei granulociti multi-potenti (CFU-GEMM) possono essere contate.

Componenti presenti:

- Metilcellulosa
- Siero bovino fetale
- Albumina sierica bovina
- Citochine, tra cui eritropoietina (EPO)
- Integratori
- Iscove's MDM

Questo prodotto ha delle componenti biologiche che non possono essere completamente definite e quantificate.

CONTROLLI DI QUALITÀ

I terreni in metilcellulosa MethoCult™ sono prodotti in condizioni sterili utilizzando processi rigorosamente controllati e componenti accuratamente selezionati.

Ogni lotto di MethoCult™ è testato per la sterilità secondo gli standard USP e sottoposto a controlli di qualità per verificare le performance di crescita mediante saggi clonogenici su campioni umani di CB. Il Certificato di analisi è disponibile su richiesta.

LIMITAZIONI

Il prodotto ha il marchio CE nell'Unione Europea in conformità alla Direttiva 98/79/CE per i Dispositivi Diagnostici *In Vitro* ed è conforme ai suoi requisiti.

Si possono applicare ulteriori termini e condizioni.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare a temperature comprese tra -15°C e -25°C. Prodotto stabile a 15 e 25°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Non congelare e scongelare ripetutamente.

Qualora il prodotto ricevuto si presenti parzialmente scongelato, porlo immediatamente a -20°C.

PRECAUZIONI

1. Solo per utilizzatori professionisti.
2. Questo prodotto deve essere maneggiato da personale esperto che osservi le norme procedurali di laboratorio. Una volta aggiunte le cellule umane al terreno, questo deve essere maneggiato come potenzialmente infetto. Per l'utilizzo dei reagenti e il loro smaltimento si devono osservare tutte le direttive locali o nazionali.
3. Questo prodotto è potenzialmente irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la pelle. Può essere nocivo se ingerito. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi, l'inalazione e l'ingestione. Può causare reazioni allergiche in individui sensibili.

MATERIALI SPECIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Strumentazione

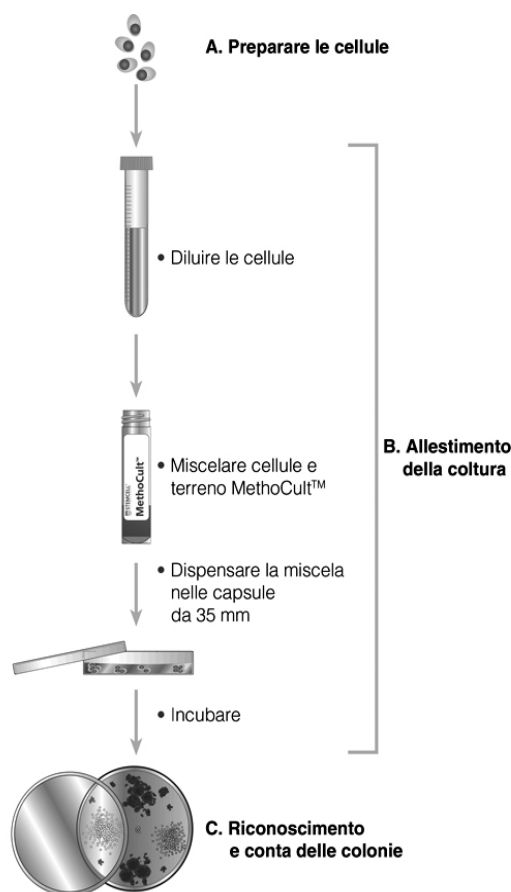
- Cappa di sicurezza Biohazard certificata a Livello II per la manipolazione di materiali biologici. *Tutte le procedure di manipolazione delle cellule e dei saggi clonogenici devono essere eseguite in sterilità ed in condizioni di sicurezza per l'operatore.*
- L'incubatore deve essere impostato a 37°C con il 5% di CO₂ e umidità superiore al 95%. *Si consiglia un incubatore a camicia d'acqua con vasca d'acqua all'interno della camera.*
- Microscopio invertito. *Si consiglia l'uso di un microscopio invertito di qualità, con obiettivi oculari 10 o 12,5X e obiettivi planari 2X, 4X e 10X. Si raccomanda un filtro blu.*
- STEMvision™, per l'imaging automatizzato e il conteggio delle colonie ematopoietiche, può essere utilizzata al posto del microscopio per contare le colonie nel saggio clonogenico a 7 giorni. Per maggiori dettagli, consultare il sito www.stemcell.com.
- Strumenti richiesti per processare e contare le cellule.

Materiali e reagenti

- Terreno di lavaggio MethoCult™ (Catalogo #87700)
- Aghi a punta piatta da 16-gauge (Catalogo #28110/28120)*
- Piastre di coltura da 35 mm pre-testate (Catalogo #27100/27150)*
- Piastre grigliate per la conta da 60 mm (Catalogo #27500)*
- Siringhe (Luer lock): da 3 mL, 6 mL
- Pipette e provette in polistirene sterili
- Capsule Petri usa e getta da 100 mm
- Acqua distillata sterile
- Reagenti e materiali richiesti per processare e contare le cellule.

*Si raccomanda l'uso di prodotti STEMCELL Technologies con i numeri di Catalogo indicati. Vedere Note.

INDICAZIONI DI UTILIZZO



Per istruzioni più dettagliate fare riferimento al Manuale tecnico "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Catalogo del Manuale #28404) disponibile al sito www.stemcell.com.

Disponibile solo in lingua inglese.

A. Preparazione delle cellule

1. Il campione di partenza ed il metodo per processare le cellule variano e dipendono dal laboratorio.
2. Si consiglia di lavare e diluire le cellule nel terreno di lavaggio MethoCult™ (Catalogo #87700).
3. Esempi di campioni idonei:
 - a. **La sospensione di cellule purificata dai globuli rossi** può essere preparata tramite la lisi dei globuli rossi utilizzando una soluzione di ammonio cloruro (Catalogo #07800/07850), seguendo la procedura descritta nel Manuale tecnico (Catalogo del Manuale #28404).
 - b. **Il sangue cordonale intero** che sia stato **crioconservato** può essere **scongelato** secondo la procedura operativa del proprio istituto. Un suggerimento sulla procedura è fornito nel Manuale tecnico (Catalogo del Manuale #28404). *I globuli rossi e altre cellule mature (ad esempio i granulociti) sono sensibili alla crioconservazione e*

andranno incontro a lisi, riducendo in maniera significativa il background nelle piastre.

- c. **Le cellule mononucleari** possono essere preparate tramite centrifuga con Ficoll-Paque™ PLUS o PREMIUM.

Ficoll-Paque™ è un marchio di fabbrica di GE Healthcare Limited.

4. Contare le cellule nucleate utilizzando un ematocritometro dopo diluizione con acido acetico al 3% contenente blu di metilene (Catalogo #07060) o utilizzando un contacellule automatico. Quando si lavora su preparazioni cellulari dove sia prevista una riduzione della vitalità delle cellule (ad esempio cellule crioconservate), è buona norma saggiare la vitalità delle cellule (ad esempio con l'esclusione del colorante blu tripano (Catalogo # 07050)).

B. Esecuzione del test Human Colony-forming Cell

1. Scongela le provette di MethoCult™ mettendole il giorno prima a 2 - 8°C oppure a temperatura ambiente 15 - 25°C.
2. **Diluizione delle cellule:** preparare una sospensione cellulare 10X (vedere Tabella 1 e Note) di cellule nel MethoCult™ Cell Wash Medium (Catalogo #87700). Ad esempio, preparare un campione di cellule 5×10^5 /mL per una concentrazione di 5×10^4 cellule per ogni piastra.

Il contenuto e la qualità dei progenitori nelle preparazioni di sangue cordonale individuale può essere altamente variabile. Disporre le cellule in piastra a 2 - 4 densità differenti per assicurare che siano seminate cellule sufficienti per ottenere circa 25 - 120 colonie per 35 mm di piastra (1,1 mL di coltura).

3. Aggiungere 0,3 mL di cellule a 3 mL di MethoCult™.
- Questo è un rapporto 1:10 v/v di cellule: il terreno così raggiunge una corretta viscosità che assicura una crescita ottimale delle CFC ed una loro corretta morfologia.*
4. Vorticare la provetta per mescolare il contenuto con cura e lasciare, quindi, riposare per 2 - 5 minuti per consentire alle bolle d'aria di dissolversi prima della dispensazione.
5. **Dispensazione:** Utilizzando una siringa da 3 mL collegata a un ago a punta piatta da 16 gauge, dispensare 1,1 mL di miscela MethoCult™ contenente cellule in 2 (o 3) piastre da 35 mm (Catalogo #27100/27150). Ruotare e inclinare delicatamente ogni capsula per distribuire omogeneamente la metilcellulosa.
6. **Aggiungere 3 mL** di acqua sterile ad una piastra da 35 mm senza coperchio. Per i test in duplicato, posizionare tutte e 3 le piastre in una capsula per coltura da 100 mm.
- In ogni caso è indispensabile aggiungere una capsula con acqua per mantenere una corretta umidità.*
7. **Incubare** a 37°C, al 5% di CO₂, con $\geq$ umidità al 95% per 7 giorni (o 14 - 16 giorni, se necessario). Le corrette condizioni di coltura sono un fattore critico per la crescita ottimale delle CFC. Si consiglia un incubatore a camicia d'acqua con vasca d'acqua all'interno della camera ed un controllo frequente della temperatura e del livello di CO₂ (vedere Note).

C. Identificación y Recuento de Colonias Classificazione e conta delle colonie

Consigli per la conta

Si consiglia l'uso di un microscopio invertito dotato di obiettivi planari da 2X, 4X e 10X e adattatore per piastre grigliate da 60 mm (Catalogo #27500). Un filtro blu renderà più visibile il colore rosso degli eritroblasti emoglobinizati nelle CFU-E, BFU-E e CFU-GEMM durante la conta delle colonie al 14 - 16 giorno.

Conta dopo 7 giorni

Osservare la piastra a basso ingrandimento (obiettivo 2X, ingrandimento 20 - 25X) per valutare la distribuzione relativa delle colonie. Contare le colonie con l'obiettivo 4X e contare tutte le colonie contenenti più di 20 cellule. Dato che molte colonie sono immature, contare i tipi di colonie individuali (ad esempio BFU-E e CFU-GM) non è raccomandato dopo soli 7 giorni. Per avere esempi sulla conta di colonie dopo 7 giorni di coltura nel MethoCult™ Express, fare riferimento al Manuale tecnico (Catalogo del Manuale #28404).

Conta dopo 14 - 16 giorni

NOTA: Le colonie derivate da sangue cordonale attraverso il MethoCult™ Express dopo 14 giorni di coltura possono essere molto vaste e può essere difficile distinguere accuratamente, in piastra, le colonie individuali ad alta concentrazione di cellule. La semina in piastra a differenti concentrazioni cellulari è raccomandata per valutare le frequenze dei progenitori (vedi tabella 1).

Le BFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM mature possono essere differenziate e contate utilizzando i criteri standard. Fare riferimento al Manuale tecnico "Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™" (Catalogo del Manuale #28404) disponibile al sito www.stemcell.com.

Osservare prima la piastra a basso ingrandimento (obiettivo 2X, ingrandimento 20 - 25X) per valutare la distribuzione relativa delle colonie. Contare le colonie BFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM a basso o medio ingrandimento e utilizzare l'ingrandimento alto per confermare il tipo di colonie come richiesto.

DESCRIZIONE DELLE COLONIE

Conta dopo 14 - 16 giorni

BFU-E: la Burst-forming unit-erythroid produce una colonia contenente più di 200 eritroblasti, di solito sono presenti più di 2 clusters.

CFU-GM: la Colony-forming unit-granulocyte, macrophage produce una colonia contenente più di 40 granulociti e macrofagi.

CFU-G e CFU-M: Le colonie contengono, rispettivamente, >40 granulociti e macrofagi.

CFU-GEMM: la Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte produce una colonia contenente sia cellule eritroidi che 20 o più granulociti, macrofagi e megacariociti.

NOTE

1. Si consiglia di usare siringhe e aghi larghi a punta piatta per una dispensazione accurata del terreno viscoso in metilcellulosa e per prevenire ferite con materiale potenzialmente infetto.
2. È molto importante utilizzare capsule Petri che siano testate per una bassa aderenza cellulare al fine di non inibire la crescita delle CFC o interferire con il riconoscimento delle colonie.
3. È importante monitorare costantemente la temperatura dell'incubatore, il livello di CO₂ e l'umidità per assicurare le corrette condizioni di coltura.
4. Si possono utilizzare sia campioni di cellule fresche che congelate.
5. La procedura idonea per processare le cellule deve essere stabilita dal laboratorio. Ad esempio, i campioni di sangue cordonale fresco purificato da globuli rossi attraverso la sedimentazione con HetaSep™ (Catalogo #07806/07906) possono contenere globuli rossi residui che interferiscono con la ricerca e l'identificazione delle colonie.
6. L'identificazione automatica e la conta delle colonie dopo 7 giorni di coltura può essere eseguita utilizzando STEMvision™ con l'algoritmo MethoCult™ Express (per saggi su CFC di 7 giorni). Per utilizzare STEMvision™, i saggi devono essere impostati nelle capsule SmartDish™ e non nelle piastre da 35 mm. Per maggiori dettagli, consultare il sito www.stemcell.com.
7. Per ulteriori informazioni tecniche sul riconoscimento e la conta delle colonie ematopoietiche, fare riferimento alle pubblicazioni di seguito citate e al Technical Manual for Human Colony-Forming Cell Assays (Catalogo del Manuale #28404).
Disponibile solo in lingua inglese.

Tabella 1. Quantità raccomandate di cellule da piastrare
Concentrazioni

PROCEDENCIA DE LAS CÉLULAS	CÉLULAS POR PLACA DE 35 MM
SC, purificato da globuli rossi	2 x 10 ⁴ - 5 x 10 ⁴
SC intero, crioconservato	3 x 10 ⁴ - 5 x 10 ⁴
SC mononucleare	1 x 10 ⁴ - 2 x 10 ⁴

BIBLIOGRAFIA

1. Eaves CJ: Assays of hematopoietic progenitor cells. Williams Hematology, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995.
2. Eaves C and Lambie K: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. STEMCELL Technologies, Inc., 1995. *Disponibile solo in lingua inglese (Catalogo #28700).*
3. Nissen-Druey C, Tichelli A and Meyer-Monard S: Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. S. Karger Medical and Scientific Publishers, 2005. Reprint of Acta Haematol 113 (1): 5-96, 2005. *Disponibile solo in lingua inglese (Catalogo #28760).*
4. Atlante delle colonie ematopoietiche da sangue cordonale. STEMCELL Technologies, Catalogo # 29940, www.stemcell.com. *Disponibile solo in inglese.*

ASSISTENZA TECNICA

Per informazioni tecniche potete contattarci via email a info@stemcell.com o chiamare il numero **+1.604.877.0713**. Per ulteriori informazioni visitate il nostro sito www.stemcell.com.

EC REP MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Numero di catalogo o di riferimento	LOT Lotto	 Usare da: MM-AAAA
 Attenzione, consultare i documenti allegati	IVD Dispositivo medico diagnostico in vitro	 Conservare entro il range di temperatura
STERILE A In sterilità	 ID del produttore (nome e indirizzo)	EC REP Rappresentante autorizzato EC dalla Comunità Europea
CE Marchio CE		

MethoCult™ Express**Methylcellulose-Medium mit rekombinanten Zytokinen**

FÜR HÄMATOPOETISCHE KOLONIE-ASSAYS VON MENSCHLICHEN ZELLEN

REF 04447**24 x 3 mL****VERWENDUNG**

MethoCult™ Express ist für den Nachweis und die Quantifizierung von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen in Nabelschnurblut-(CB)-Proben mittels koloniebildender Zell-Ansätze (CFC-Assays) nach einer Inkubationsperiode von mindestens 7 Tagen vorgesehen. Es ist für Erythrozyten-depletierte Nabelschnurblutproben, kryopräservierte und aufgetaute Nabelschnurvollblutproben und mononukleäre Nabelschnurblutzellen vorgesehen.

Nur für professionelle *in-vitro*- Diagnostik.**PRODUKTBESCHREIBUNG**

MethoCult™ Express ist für den Nachweis und die Zählung von humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen nach viel kürzeren Inkubationszeiten als die 14-16 Tage bei Standard-CFC-Assays optimiert. Mit MethoCult™ Express können Kolonien, die mindestens 20 Zellen enthalten, bereits nach 7 Inkubationstagen gezählt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind die meisten Kolonien unreif und noch nicht in morphologisch unterscheidbare Kolonietypen differenziert. Deshalb liefern die nach 7 Inkubationstagen gezählten Kolonien Informationen zur Gesamthäufigkeit von hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Probe ohne Unterscheidung zwischen verschiedenen Vorläuferzelltypen.

Wenn MethoCult™ Express-Kulturen für 14-16 Tage inkubiert werden, können von erythroiden Vorläuferzellen (BFU-E), Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen (CFU-GM, CFU-M, CFU-G) und multipotenten Granulozyten-, Erythrozyten, Makrophagen- und Megakaryozyten-Vorläuferzellen (CFU-GEMM) abgeleitete Kolonien gezählt werden.

Bestandteile umfassen:

- Methylcellulose
- Fötales Kälberserum
- Rinder Serumalbumin
- Zytokine, einschließlich Erythropoetin (EPO)
- Zusätze
- Iscove's MDM

Dieses Produkt ist ein biologisches Reagenz und kann als Solches nicht vollständig charakterisiert oder quantifiziert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

MethoCult™ Methylcellulose-basierte Medien werden aseptisch und in streng kontrollierten Fertigungsabläufen u. unter Verwendung von umfangreich vorgetesteten Bestandteilen hergestellt.

Jede Lot MethoCult™ wird gemäß USP Standard auf Sterilität getestet und. Die Qualität wird mit Hilfe von CFC-Assays mit humanen NSB-Proben geprüft. Ein Analysezertifikat ist auf Anfrage erhältlich.

HAFTUNGSBESCHRÄNKUNGEN

Das Produkt ist in der Europäischen Union gemäß IVD-Richtlinie 98/79/EG für In-vitro-Diagnostika mit der CE-Marke versehen und erfüllt deren Anforderungen.

Je nach Land bzw. Region können ggf. zusätzliche Bestimmungen zur Anwendung kommen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Bei -15 °C bis -25 °C lagern. Produktstabilität bei -15 bis -25 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum.

Nicht wiederholt auftauen und einfrieren.

Wenn das Produkt teilweise aufgetaut empfangen wird, sofort bei -20 °C einfrieren.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Nur für qualifizierte Anwender.
2. Dieses Produkt sollte nur von ausgebildetem Personal unter Beachtung von GLP Bestimmungen angewandt werden. Nach dem Zusatz von humanen Zellen ist es als potentiell biologischer Gefahrstoff zu betrachten und gemäß den dafür geltenden Vorschriften oder Vorsichtsmaßnahmen bei Umgang und Entsorgung zu behandeln.
3. Dieses Produkt kann zu Reizungen von Augen, Atemwegen und Haut führen. Es kann bei Einnahme auch gesundheitsschädlich sein. Kontakt mit Augen und Haut vermeiden, nicht einatmen oder schlucken. Kann bei empfindlichen Personen zu allergischen Reaktionen führen.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES MATERIAL

Ausrüstung

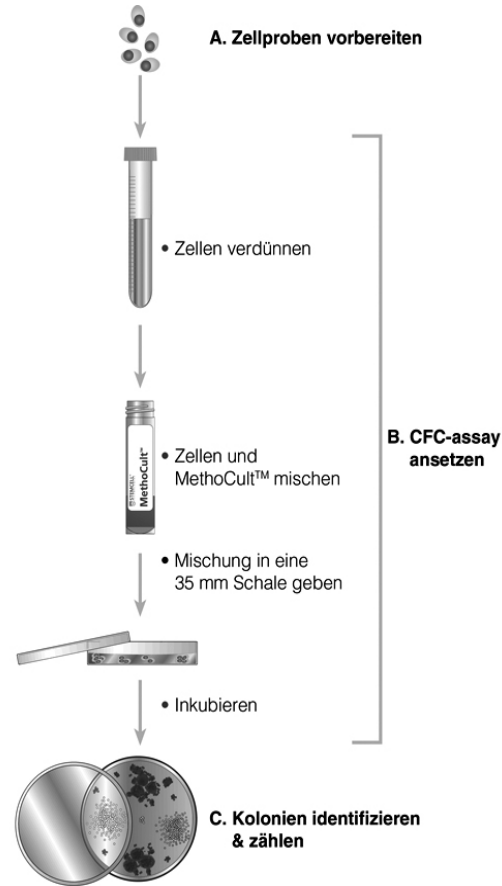
- Sicherheitswerkbank der Klasse II für biologische Materialien. Alle Zell-verarbeitungsprozesse und Ansätze von CFC-Assays sollten aseptisch und unter Beachtung globaler Sicherheitsvorschriften durchgeführt werden.
- Inkubator eingestellt auf 37 °C mit 5% CO₂ Gehalt und ≥95% Luftfeuchtigkeit. Der Gebrauch eines Wassermantel-Inkubators mit Wasserpfanne in der Kammer wird empfohlen.
- Inversmikroskop. Der Gebrauch eines Inversmikroskops guter Qualität mit 10 oder 12,5X Okular und 2, 4, und 10X Planar-Objektiven und einem Blaufilter wird empfohlen.
- Das STEMvision™-Instrument zur automatisierten Bildgebung und Auswertung von hämatopoetischen Kolonien kann im 7-Tage-CFC-Assay anstelle eines Mikroskops für die Auswertung von Kolonien verwendet werden. Weitere Informationen unter www.stemcell.com.
- Ausrüstung für Zellverarbeitung und Zellzählung.

Reagenzien und Materialien

- MethoCult™ Zell-Waschmedium (Katalognr. 87700)
- 16-gauge Blunt-end (stumpfe) Kanülen (Katalognr. 28110/28120)*
- 35 mm vorgetestete Petrischalen (Katalognr. 27100/27150)*
- 60 mm gradierte Kultur Schalen (Katalognr. 27500)*
- Spritzen (Luer lock): 3 mL, 6 mL
- Sterile Pipetten und sterile Polystyrol Röhrchen
- 100 mm Einmal-Petrischalen
- Steriles, destilliertes Wasser
- Ausrüstung für Zellverarbeitung und Zellzählung

*Die Verwendung von STEMCELL Technologies Produkten mit den angegebenen Katalognummern wird empfohlen. Siehe Anmerkungen.

HANDHABUNG UND GEBRAUCHSANLEITUNG



Ausführlichere Anweisungen sind im technischen Handbuch „Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™“ (Handbuch-Katalognummer 28404) angegeben, erhältlich unter www.stemcell.com.

Nur in Englisch verfügbar.

A. Zellprobe vorbereiten

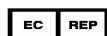
1. Die Art und Aufbereitungsmethode der humanen Zellprobe hängt von den individuellen Laboranforderungen ab.
2. Es wird empfohlen, Zellproben mit MethoCult™ Zell-Waschmedium (Katalognr. 87700) zu waschen und zu verdünnen.
3. Nachfolgend einige Beispiele für geeignete Techniken der Zellverarbeitung:
 - a. **Erythrozyten-depletierte Suspensionen** können durch Lyse der roten Blutzellen (RBC) mit Hilfe von Ammoniumchloridlösung (Katalognr. 07800/07850) wie im technischen Handbuch (Handbuch-Katalognr. 28404) beschrieben vorbereitet werden.
 - b. **Nabelschnurvollblut, das kryopräserviert wurde**, kann den Betriebsverfahren Ihrer Institution entsprechend **aufgetaut** werden. Ein empfohlenes Verfahren ist im technischen Handbuch angegeben (Handbuch-Katalognr. 28404).

STEMCELL Technologies Inc | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com



MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany



#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 18 of 20

28404). Rote Blutzellen und andere reife Zellen (z. B. Granulozyten) sind Kryopräservierung gegenüber empfindlich und lysieren. Dadurch kann der Hintergrund in den Schalen signifikant reduziert werden.

- c. **Mononukleäre Zellen** können mittels Zentrifugation mit Ficoll-Paque™ PLUS oder PREMIUM vorbereitet werden.

Ficoll-Paque™ ist ein eingetragenes Warenzeichen von GE Healthcare Ltd.

4. Nukleäre Zellen nach Verdünnung mit 3%iger Essigsäure mit Methylenblau (Katalognr. 07060) mit einem Hämazytometer oder einem automatisierten Zellzähler zählen. *Testmethoden für lebensfähige Zellen (z. B. Trypanblau-Ausschluss (Katalognr. 07050)) sollten zu Zellpräparationen verwendet werden, bei denen eine Abnahme der Zellvitalität zu erwarten ist (z. B. kryopräservierte Zellen).*

B. Ansatz von humanen CFC-Assays

1. MethoCult™ Röhrchen über Nacht im Kühlschrank (2-8 °C) oder bei Raumtemperatur auftauen (15-25 °C).
2. **Zellen verdünnen:** Eine 10-fach konzentrierte Zellsuspension (siehe Tabelle 1 und Anmerkung 1) in MethoCult™ Cell Wash Medium (Katalognr. 87700) herstellen. Zum Beispiel eine Zellprobe von 5×10^5 pro mL herstellen, um eine Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen pro 35mm Petrischale zu erreichen.

Der Vorläuferzellinhalt und die Qualität der individuellen Nabelschnurblutpräparationen können stark schwanken. Die Zellen mit 2-4 verschiedenen Dichten plattieren, um sicherzustellen, dass die Zellen ungefähr 25-120 Kolonien pro 35 mm Schale ergeben (1,1 mL Kultur).

3. 0,3 mL Zellen in 3 mL MethoCult™ aufnehmen.
Dieses 1:10 v/v Verhältnis von Zellen: Medium ergibt die richtige Mediumviskosität, um optimales CFC-Wachstum und Morphologie zu gewährleisten.
4. Das Röhrchen durch Vortexen gründlich vermischen und vor dem Ausplattieren dann 2-5 Minuten stehen lassen, damit die Bläschen an die Oberfläche steigen können.
5. **Ausplattieren:** Mit einer an einer stumpfen Nadel Größe 16 angebrachten 3-mL-Spritze 1,1 mL MethoCult™-Mischung mit den Zellen in 2 (oder 3) 35mm-Schalen geben (Katalognr. 27100/27150). Jede Schale vorsichtig kippen und schwenken, um die Methylzellulose gleichmäßig zu verteilen.
6. **3 mL** steriles Wasser in eine offene 35mm Kulturschale **geben**. Für Doppel-Ansätze alle drei Schalen in eine 100mm Kulturschale stellen. *Immer mit Wasser gefüllten Schalen für Feuchtigkeit sorgen.*
7. Bei 37 °C, 5 % CO₂ und ≥95 % Feuchtigkeit für 7 Tage **inkubieren** (oder 14-16 Tage, falls erwünscht). Korrekte Kulturbedingungen sind wichtig für optimales CFC-Wachstum. *Ein Wassermantel-Inkubator mit Wasser-pfanne in der Kammer und die regelmäßige Überwachung von Temperatur und CO₂ Gehalt wird empfohlen (siehe Anmerkungen).*

C. Identifikation und Zählung der Kolonien

Auswertung Überblick

Ein qualitativ hochwertiges Inversmikroskop mit 2X, 4X und 10X Planar-Objektiven und Halterung für eine 60mm-Rasterschale verwenden (Katalognr. 27500). Ein Blaufilter verstärkt die rote Farbe von hämoglobinisierten Erythroblasten in CFU-E, BFU-E und CFU-GEMM beim Zählen der Kolonien nach 14-16 Tagen.

Auswertung nach 7 Tagen

Die Schale mit geringer Vergrößerung (2X Objektiv, 20-25X Vergrößerung) scannen, um die relative Verteilung der Kolonien festzustellen. Für die Auswertung der Kolonien ein 4X-Objektiv verwenden, und alle Kolonien zählen, die mehr als 20 Zellen enthalten. Da die meisten Kolonien unreif sind, wird die Auswertung von individuellen Kolonietypen (d. h. BFU-E und CFU-GM) nicht bereits nach 7 Tagen empfohlen. Beispiele für Kolonien, die nach 7 Inkubationstagen in MethoCult™ Express gezählt wurden, sind dem technischen Handbuch zu entnehmen (Handbuch-Katalognr. 28404).

Auswertung nach 14-16 Tagen

HINWEIS: Aus Nabelschnurblut abgeleitete Kolonien in MethoCult™ Express können nach 14 Inkubationstagen sehr groß sein und es könnte schwierig sein, individuelle Kolonien in mit hohen Zellkonzentrationen plattierten Schalen akkurat zu unterscheiden. Zur Bewertung von Vorläuferzellhäufigkeiten wird die Plattierung mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen empfohlen (siehe Tabelle 1).

Reife BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM können mit Standardkriterien unterschieden und gezählt werden. Siehe „Human Colony - Forming Cell Assays Using MethoCult™“ im technischen Handbuch (Handbuch-Katalognummer 28404), erhältlich unter www.stemcell.com.

Die Schale zuerst bei geringer Vergrößerung (2X Objektiv, 20-25X Vergrößerung) scannen, um die relative Verteilung der Kolonien festzustellen. BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM bei geringer oder mittlerer Vergrößerung auszählen. Die Kolonietypen falls nötig mit starker Vergrößerung bestätigen.

BESCHREIBUNGEN DER KOLONIEN

Auswertung nach 14-16 Tagen

BFU-E: (burst-forming unit-erythroid) bildet eine Kolonie mit >200 Erythroblasten, in der Regel in mehr als 2 clusters vorhanden.

GFU-GM: (Colony-forming unit-granulocyte, macrophage) bildet eine Kolonie mit >40 Granulozyten und Makrophagen.

CFU-G und **CFU-M:** Kolonien enthalten >40 Granulozyten bzw. Makrophagen.

CFU-GEMM: (Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte) bilden eine Kolonie mit erythroiden Zellen und 20 oder mehr Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten.

ANMERKUNGEN

1. Spritzen mit dicken blunt-end Kanülen sollten zum akuraten Verteilen von viskosem Methylzellulosemedium und zur Vermeidung von Stichverletzungen benutzt werden.
2. Die Verwendung von Petrischalen mit geringer Adhärenz ist wichtig, da übermäßige Zelladhärenz das CFC-Wachstum behindern oder beim Erkennen der Kolonien stören kann.
3. Um ordnungsgemäße Zellkulturbedingungen zu gewährleisten, ist es wichtig, die Temperatur, den CO₂ Gehalt und die Feuchtigkeit regelmäßig zu überwachen.
4. Die verwendeten Zellproben können frisch oder kryokonserviert sein.
5. In jedem Labor müssen geeignete Zellverarbeitungsverfahren festgelegt werden. Beispiel: Frische Nabelschnurblutproben, die durch Sedimentation mit HetaSep™ (Katalognr. 07806/07906) Erythrozyten-depletiert wurden, könnten Rest-Erythrozyten enthalten, was den Nachweis und die Identifikation von Kolonien beeinträchtigen könnte.
6. Automatisierte Identifikation und Auswertung von Kolonien nach 7 Inkubationstagen kann mit STEMvision™ mit dem MethoCult™ Express-Algorithmus (für 7-Tage-CFC-Assays) durchgeführt werden. Für die Verwendung mit STEMvision™ müssen die Assays in SmartDish™-Kulturschalen anstatt in 35mm-Schalen angesetzt werden. Weitere Informationen unter www.stemcell.com.
7. Zusätzliche Hinweise beim Erkennen und Zählen von humanen hämatopoietischen Kolonien sind in den untenstehenden Referenzen und in der Technical Manual for Human Colony-Forming Cell Assays (Handbuch-Katalognummer 28404) enthalten.

Nur in Englisch verfügbar.

Tabelle 1. Empfohlene Zellaussaatdichten

PROBENMATERIAL	ZELLEN PRO 35 MM PETRISCHALE
Nabelschnurblut, Erythrozyten-depletiert	$2 \times 10^4 - 5 \times 10^4$
Nabelschnurvollblut, kryopräserviert	$3 \times 10^4 - 5 \times 10^4$
Mononukleäre Nabelschnurblutzellen	$1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$

REFERENZEN

1. Eaves CJ: Assays of hematopoietic progenitor cells. Williams Hematology, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995.
2. Eaves C and Lambie K: Atlas of Human Hematopoietic Colonies. STEMCELL Technologies, Inc., 1995. *Nur in Englisch verfügbar (Katalognr. 28700).*
3. Nissen-Druey C, Tichelli A and Meyer-Monard S: Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. S. Karger Medical and Scientific Publishers, 2005. Reprint of Acta Haematol 113 (1): 5-96, 2005. *Nur in Englisch verfügbar (Katalognr. 28760).*
4. Atlas of Hematopoietic Colonies from Cord Blood. STEMCELL Technologies, Katalognr. 29940, www.stemcell.com. *Nur in englischer Sprache verfügbar.*

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Technische Unterstützung erhalten sie per e-mail via: info@stemcell.com oder telefonisch unter **+1.604.877.0713**. Weitere Informationen auf unserer homepage: www.stemcell.com.

EC REP MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany

REF Katalog oder Referenznummer	LOT Lotnummer	 Verbrauch bis: MM-JJJJ
 Vorsicht, beiliegende Dokumentation beachten	IVD In Vitro Diagnostisches Medizinprodukt	 Für Lagerung innerhalb der Temperaturgrenzen
STERILE A Aseptische Verarbeitung	 Hersteller Identifikation (Name & Adresse)	EC REP Autorisierter Händler innerhalb der EU
 CE Zeichen		

 **STEMCELL Technologies Inc** | 400 – 570 West 7th Avenue, Vancouver, BC | V5Z 1B3 | Canada | www.stemcell.com

For Technical Assistance

Tel: +1.604.877.0713

e-mail: info@stemcell.com

EC REP

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover • Germany

#29094

Version 1.0.0

March 2012

Page 20 of 20