

CHANG Amnio

with Gentamicin and L-Glutamine

Catalog No. 99473

100 mL, 500 mL

For *in vitro* diagnostic use.

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Pour diagnostics *in vitro*.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Til *in vitro*-diagnostik.

In vitro -diagnostikkaan.

Lietošanai *in vitro* diagnostikā.

Uitsluitend voor *in vitro* diagnostisch gebruik.

Do diagnostyki *in vitro*.

Pentru uz diagnostic *in vitro*.

För *in vitro*-diagnostik.

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks.

In vitro diagnosztikai alkalmazáshoz.

Skirta *in vitro* diagnostikai.

In vitro diagnostik kullanim için.

Na diagnostické použitie *in vitro*.

3a *in vitro* диагностична употреба.

Za upotrebu *u in vitro* dijagnostici.

Ghal užu dijanostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

REF

LOT

STERILE A



















Catalog Number

Lot Number

Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)

Expiration:
Year - Month - Day

Caution, consult accompanying documents

Consult instructions for use

Storage Temperature
store below -10°C

Do Not Re-Sterilize

Do not use if package is damaged

Manufacturer

CE Mark

Emergo Europe - Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

*Symbol Reference - **EN ISO 15223-1**, Medical devices – Symbols to be used with medical device labels, labeling.

INDICATION FOR USE
CHANG Amnio with Gentamicin and L-Glutamine may be used for the following applications:

- the primary culture of amniotic fluid cells
- growing passaged amniotic fluid cells
- solid amnion tissue from chorionic villi sampling.

This medium has been designed for use in CO₂ incubators (cultures equilibrated with 5%-8% CO₂ atmosphere).

The final pH must be 6.65-7.44 Please see Directions for Use.

DEVICE DESCRIPTION
CHANG Amnio is a complete, ready-to-use medium for the primary culture of human amniotic fluid cells (AFC), chorionic villus sampling (CVS), and products of conception (POC) for use in karyotyping and other prenatal genetic testing. It has been optimized for both flask and *in situ* methodologies. This product contains the antibiotic Gentamicin Sulfate (50 µg/mL).

COMPONENTS		
<u>Buffers</u>	<u>Proteins, Hormones, and Growth Factors</u>	Magnesium sulfate
Sodium bicarbonate	Fetal bovine serum (FBS)	Sodium phosphate
<u>Antioxidant</u>	Newborn bovine serum	<u>Nucleic acids</u>
Thioctic acid	Human transferrin	Deoxyadenosine
<u>Antibiotic</u>	Fibroblast growth factor (FGF)	Deoxycytidine
Gentamicin Sulfate	Insulin	Deoxyguanosine
<u>Amino Acid</u>	Progesterone	Adenosine
Alanine	Testosterone	Cytidine
Arginine	Beta estradiol	Guanosine
Asparagine	Hydrocortisone	Thymidine
Aspartic Acid		Uridine
Cysteine		<u>Other</u>
Glutamic Acid		Ethyl alcohol
Glutamine		Thyronine
Glycine		<u>Vitamins and trace elements</u>
Histidine		Ascorbic acid
Isoleucine		Folic acid
Leucine		Nicotinamide
Lysine		Riboflavin
Methionine		Thiamine
Phenylalanine		Pantothenic acid
Proline		Cobalamin
Serine		Pyridoxine
Threonine		Biotin
Tryptophan		<u>Water</u>
Tyrosine		WFI Quality
Valine		

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

PREPARATION FOR USE
Thaw on a sterile countertop at room temperature or by placing bottle in a 37°C water bath.

CHANG Amnio contains gentamicin (50 mg/L). Additional antibiotics may be added if desired.

ALIUQUOTING CHANG Amnio

- Thaw CHANG Amnio according to the above instructions.
- Distribute aseptically into convenient sized aliquots and refreeze.
- Thaw aliquots in 37°C water bath when ready to use.

DIRECTIONS FOR USE
Use of CHANG Amnio for Primary Cultures: *in situ* Methodologies

- Centrifuge amniotic fluid at approx. 1,200 rpm for 10 minutes to concentrate the cells.
- Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving approx. 0.5 mL above cell pellet (or about 2x volume of pellet) of spun amniotic fluid. Aliquot supernatant

(at least 1 mL, if possible) for alpha-fetoprotein (AFP) and acetyl cholinesterase assays, if necessary. If specimen is bloody, prepare an additional aliquot for further testing. Resuspend cell pellet in small volume of patient's own amniotic fluid. Add sufficient CHANG Amnio to the concentrated cell suspension to allow for final plating volume of 0.5 mL per coverslip (total of 4 coverslips, depending on size of cell pellet) or 2 mL per flaskette. If specimen is received from a patient in the third trimester of pregnancy, the pellet may be larger but contain less viable cells, thus requiring heavier seeding (less media than normal).

- Incubate cultures undisturbed at 37°C 5-8% CO₂ atmosphere.
- Flood cultures on day 2 by adding 2 mL of CHANG Amnio.
- After 4 to 5 days, cultures should be checked for growth. Cultures should be fed once growth has been observed. Feed cultures by removing all of the culture supernatant and replacing with 2 mL fresh CHANG Amnio. It is recommended that cultures be fed every 2 days thereafter. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
- Check cultures for growth on, or after, day 5, and harvest when sufficient colonies are observed.
- Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

Use of CHANG Amnio for Primary Cultures: Flask Methodologies

- Centrifuge amniotic fluid at approx. 1,200 rpm for 10 minutes to concentrate the cells.
- Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving approx. 0.5 mL above cell pellet (or about 2x volume of pellet) of spun amniotic fluid. Aliquot supernatant (at least 1 mL, if possible) for alpha-fetoprotein (AFP) and acetyl cholinesterase assays, if necessary. If specimen is bloody, prepare an additional aliquot for further testing. Resuspend cell pellet in small volume of patient's own amniotic fluid. Add 4 mL of CHANG Amnio for a total volume of 5 mL per flask. If specimen is received from a patient in the third trimester of pregnancy, the pellet may be larger but contain less viable cells, thus requiring heavier seeding (less media than normal).
- Incubate cultures undisturbed at 37°C, 5%-8% CO₂ atmosphere.
- Check for growth on day 5. Change medium with 2 mL of fresh CHANG Amnio and harvest if sufficient cell growth is observed.
- Check cultures for growth and completely change medium every day thereafter until sufficient colonies are observed and are ready to harvest. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
- Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

Use of CHANG Amnio for Growing Passaged Amniotic Fluid Cells:

To passage the cells, treat cultures with trypsin (or pronase, etc.) as you would normally do when cells are grown in conventional medium. However, protease treatment should be carefully monitored. Amniotic fluid cells grown in CHANG Amnio tend to be more sensitive to protease treatment than when grown in conventional medium. It may be necessary to modify your protocol to take this into account.

Note: The pH of the medium used to feed the cultures must be between 6.65 - 7.44 (i.e. the medium must be slightly yellowish salmon color). pH can easily be adjusted by placing the medium in a 5-8% CO₂ incubator with the cap slightly loosened for about 30 minutes.

Note: Chang Amnio may develop some Calcium Oxalate and protein precipitates upon thawing. These precipitates are not known to have an effect on product performance.

Chorionic Villi Sample Preparation:

- Label a Petri dish for each specimen received, and transfer contents of sample aseptically. Add 5 mL of the prewarmed CHANG Amnio complete media to the dish, and place in an incubator for 30 minutes,

- at 35 - 39°C, 5 - 8% CO₂ atmosphere, to allow the blood to settle.
- Clean specimen using a dissecting microscope, initially under 1.5X magnification, then adjusting to about 3X magnification. Note: Approx. 20 - 40 mg of chorionic villi sample is required.
- Using two pairs of sterile forceps, remove blood clots and any maternal decidua from the villus material, while working within the dish, under the dissecting microscope. Villus material is light colored, tubular and/or lumpy with visible branches and veins.
- Transfer clean villi to another Petri dish containing prewarmed CHANG Amnio complete media. Perform final cleaning, using forceps to grasp villi and agitate gently. Note: 5 mg is the ideal amount to use per culture. Be careful to avoid damaging the fragile villi.
- Transfer villi and media to a 15 mL centrifuge tube, and add 4 drops of antibiotic (ie. Gentamicin Sulfate, 50 µL/mL) to the centrifuge tube. Let sit for 30 minutes.
- Centrifuge villi at approx. 1,400 rpm for 5 minutes.

Chorionic Villi Sample Culture:

- Aspirate supernatant from the centrifuged tube, making sure to leave 0.5 mL of media above cell pellet (or about 2X volume of pellet).
- Gently resuspend pellet. Add 2 mL of prewarmed CHANG Amnio media to centrifuge tube.
- Add 2 mL of Trypsin EDTA and incubate culture undisturbed at 35 - 39°C, 5 - 8% CO₂ atmosphere for 10 minutes. Remove tube from incubator, resuspend pellet and place in incubator for 10 additional minutes.
- Remove centrifuge tube from incubator, resuspend pellet and centrifuge for 8 -10 minutes at 1,400 rpm.
- Aspirate supernatant from the centrifuged tube. Resuspend pellet, then add 1 mL of collagenase to tube and place in incubator for 5 minutes.
- Remove from incubator and visually check to see if pellet is cloudy and no distinct pieces of individual villi can be seen. If pellet is not cloudy, place back in incubator for 5 more minutes.
- Add 3 mL of prewarmed CHANG Amnio to centrifuge tube to stop the action of the collagenase.
- Centrifuge tube for 8- 10 minutes at 1,400 rpm.
- Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving 0.5 mL of media above cell pellet. Resuspend pellet before adding CHANG Amnio used for set up.
- Set up optimal number of cultures using 0.5 mL of CHANG Amnio per culture for each petri dish that contains a coverslip.
- Incubate cultures undisturbed at 35 - 39°C, 5 - 8% CO₂ atmosphere.
- Flood cultures on day 2 by adding 1.5 mL of prewarmed CHANG Amnio.
- At 4 days, cultures should be checked for growth. If growth is observed, remove media and add 2 mL of fresh prewarmed CHANG Amnio to each coverslip. Cultures should be fed every 2 days thereafter. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
- Check cultures for growth on day 5, and harvest when sufficient colonies are observed. Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

STORAGE AND STABILITY

Store frozen below -10°C. Product is stable until the expiration date on the bottle label when stored frozen. Unused product can be dispensed into working aliquots and refrozen for later use, or tightly capped and stored at 2°C to 8°C for up to 30 days; it may be frozen a maximum of two times. 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.
Do not use any bottle in which the sterile packaging has been compromised.
Do not use CHANG Amnio beyond the expiration date indicated on the label.

 **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

© 2024 FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. All rights reserved. the Irvine Scientific logo and CHANG Amnio are trademarks of FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. in various jurisdictions.

PN 40965 Rev.06
Effective Date: 27-DEC-2024

DEUTSCH

INDIKATIONEN

CHANG Amnio mit Gentamicin und L-Glutamin kann für die folgenden Anwendungen verwendet werden:

1. Primärkultur von Fruchtwasserzellen
2. Wachsende passagierte Fruchtwasserzellen
3. Festes Amniongewebe aus einer Chorionzottenbiopsie

Dieses Medium wurde für die Verwendung in CO₂-Inkubatoren entwickelt (Kulturen, die mit 5–8%iger CO₂-Atmosphäre äquilibriert werden).

Der endgültige pH-Wert muss zwischen 6,65 und 7,44 liegen. Siehe Gebrauchsanweisung.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Das CHANG Amnio ist ein gebrauchsfertiges Komplettmedium für die Primärkultur von menschlichen Fruchtwasserzellen (AFC), Chorionzottenbiopsie (CVS) und Konzeptionsprodukten (POC) zur Verwendung bei der Karyotypisierung und für andere pränatale genetische Tests. Es wurde sowohl für Flaschen- als auch In-situ-Methoden optimiert. Dieses Produkt enthält das Antibiotikum Gentamicinsulfat (50 µg/ml).

INHALTSSTOFFE

Puffer	Proteine, Hormone und Wachstums-faktoren	Magnesiumsulfat Natriumphosphat
Natriumbicarbonat		
Antioxidans	Fetales Kälberserum (FBS)	Nukleinsäuren
Thioctansäure	Serum von neugeborenen Rindern	Desoxyadenosin Desoxycytidin Desoxyguanosin
Antibiotikum	Humanes Adenosin	Adenosin
Gentamicinsulfat	Transferrin	Cytidin
	Fibroblasten-wachstumsfaktor	Guanosin
	Insulin	Thymidin
Aminosäure	Progesteron	Uridin
Alanin	Cystein	Andere Ethylalkohol
Arginin	Glutaminsäure	Thyronin
Asparagin	Glutamin	
Asparaginsäure	Glycin	Vitamine und Spurenelemente
Cystein	Hisidin	Ascorbinsäure
Glutaminsäure	Isoleucin	Folsäure
Glutamin	Leucin	Nikotinamid
	Lysin	Riboflavin
	Methionin	Thioflavin
	Phenylalanin	Pantoin
	Prolin	Thiamin
Serin		Cobalomsäure
Theonin	Salze und Ionen	Cobalamin
Tryptophan	Natriumchlorid	Pyridoxin
Tyrosin	Natriumselenit	Biotin
Valin	Calciumchlorid	
	Cholinchlorid	Wasser
	Kaliumchlorid	Wasser für Injektionszwecke
	Kaliumphosphat	(WFI)

QUALITÄTSSICHERUNG

STERILITÄT

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

VORBEREITUNG

Zum Aufbauen bei Raumtemperatur auf einem sterilen Tisch abstellen oder die Flasche in ein 37 °C warmes Wasserbad stellen.

CHANG Amnio enthält Gentamicin (50 mg/l). Bei Bedarf können zusätzliche Antibiotika hinzugefügt werden.

ALIQOTIEREN DES CHANG Amnio

1. Das CHANG Amnio gemäß den obigen Anweisungen aufbauen.
2. Mit aseptischen Techniken in handliche Aliquote verteilen und erneut einfrieren.
3. Die Aliquote, sobald benötigt, in einem 37 °C warmem Wasserbad aufbauen.

VERWENDUNG VON CHANG Amnio

für Primärkulturen:

In-situ-Methoden

1. Das Fruchtwasser 10 Minuten bei etwa 1.200 U/min zentrifugieren, um die Zellen zu konzentrieren.
2. So viel Überstand vom zentrifugierten Röhrchen absaugen, dass ca. 0,5 ml über dem Zellpellet (oder etwa das 2-fache Volumen des Pellets) der zentrifugierten Fruchtwasserflüssigkeit verbleiben. Falls erforderlich, den Überstand (mindestens 1 ml, falls möglich) für Alpha-Fetoprotein- (AFP) und Acetylcholinesterase-Assays aliquotieren. Bei einer Probe mit hohem Blutgehalt ein zusätzliches Aliquot für weiterführende Tests anlegen. Das Zellpellet in einer kleinen Menge Fruchtwasser derselben Patientin resuspendieren. Ausreichend CHANG Amnio in die konzentrierte Zellsuspension geben, um das endgültige Überzugvolumen von 0,5 ml pro Deckglas (insgesamt 4 Deckgläser je nach Größe des Zellpellets) oder 2 ml pro Fläschchen zu erreichen. Wenn die Probe von einer Patientin im dritten Trimester stammt, kann das Pellet größer sein, aber weniger lebensfähige Zellen enthalten, sodass eine höhere Zellkonzentration erforderlich ist (weniger Medium als normal).
3. Die Kulturen ungestört bei 37 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren.
4. Die Kulturen an Tag 2 überspülen, indem 2 ml CHANG Amnio zugegeben werden.
5. Nach 4 bis 5 Tagen sollten die Kulturen auf Wachstum überprüft werden. Die Kulturen sollten genährt werden, sobald ein Wachstum festgestellt wurde. Die Kulturen nähren, indem Kulturüberstand entfernt wird und stattdessen 2 ml frisches CHANG Amnio zugegeben werden. Es wird empfohlen, dass Kulturen danach alle 2 Tage genährt werden. Bei Proben mit hohem Blutgehalt können Kulturen häufigere Medienwechsel erfordern.
6. An/oder nach Tag 5 die Kulturen auf Wachstum prüfen und entnehmen, wenn ausreichend Kolonien vorhanden sind.
7. Die besten Ergebnisse werden erreicht, wenn die Kulturen am Tag vor der Entnahme mit CHANG Amnio genährt werden.

Verwendung von CHANG Amnio für Primärkulturen: Flaschen-Methoden

1. Das Fruchtwasser 10 Minuten bei etwa 1.200 U/min zentrifugieren, um die Zellen zu konzentrieren.
2. So viel Überstand vom zentrifugierten Röhrchen absaugen, dass ca. 0,5 ml über dem Zellpellet (oder etwa das 2-fache Volumen des Pellets) der zentrifugierten Fruchtwasserflüssigkeit verbleiben. Falls erforderlich, den Überstand (mindestens 1 ml, falls möglich) für Alpha-Fetoprotein- (AFP) und Acetylcholinesterase-Assays aliquotieren. Bei einer Probe mit hohem Blutgehalt ein zusätzliches Aliquot für weiterführende Tests anlegen. Das Zellpellet in einer kleinen Menge Fruchtwasser derselben Patientin resuspendieren. 4 ml CHANG Amnio für ein Gesamtvolumen von 5 ml in die Flasche geben. Wenn die Probe von einer Patientin im dritten Trimester stammt, kann das Pellet größer sein, aber weniger lebensfähige Zellen enthalten, sodass eine höhere Zellkonzentration erforderlich ist (weniger Medium als normal).
3. Die Kulturen ungestört bei 37 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren.
4. An Tag 5 auf Wachstum prüfen. Das Medium durch 2 ml frisches CHANG Amnio ersetzen und die Kulturen entnehmen, wenn ausreichend Zellwachstum festgestellt wird.
5. Die Kulturen auf Wachstum prüfen und danach jeden Tag das Medium auswechseln, bis ausreichend Kolonien vorhanden sind und entnommen werden können. Bei Proben mit hohem Blutgehalt können Kulturen häufigere Medienwechsel erfordern.
6. Die besten Ergebnisse werden erreicht, wenn die Kulturen am Tag vor der Entnahme mit CHANG Amnio genährt werden.

Verwendung von CHANG Amnio für wachsende passagierte Fruchtwasserzellen:

Um die Zellen zu passagieren, die Kulturen mit Trypsin (oder Pronase usw.) behandeln, so wie es üblich ist, wenn Zellen in einem konventionellen Medium kultiviert werden. Eine Behandlung mit Protease sollte allerdings sorgfältig überwacht werden. In CHANG Amnio kultivierte Fruchtwasserzellen neigen dazu, empfindlicher auf eine Protease-Behandlung zu reagieren als bei Kultivierung in konventionellem Medium. Das Protokoll muss ggf. geändert werden, um dies zu berücksichtigen. Hinweis: Der pH-Wert des Mediums, das als Nährmedium der Kulturen dient, muss zwischen 6,65 und 7,44 liegen (d. h. das Medium muss leicht gelblich-lachsfarben sein). Der pH-Wert kann leicht angepasst werden, indem das Medium mit leicht gelöster Kappe für ungefähr 30 Minuten in einen 5–8%igen CO₂-Inkubator gestellt wird.

Hinweis: Nach dem Auftauen können sich in Chang Amnio Calciumoxalat- und Proteinniederschläge bilden. Es ist nicht bekannt, dass diese Niederschläge die Produktleistung beeinflussen.

Chorionzotten-Probenvorbereitung:

1. Für jede in Empfang genommene Probe eine Petrischale kennzeichnen und den Probeninhalt unter Anwendung aseptischer Techniken überführen. Der Petrischale 5 ml vorgewärmtes CHANG Amnio-Komplettmedium zusetzen und 30 Minuten lang bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren, damit sich das Blut absetzen kann.
2. Probe mithilfe eines Präpariermikroskops zunächst unter 1,5-facher Vergrößerung und dann unter etwa 3-facher Vergrößerung reinigen. Hinweis: Es werden etwa 20–40 mg Chorionzottenprobe benötigt.
3. In der Petrischale unter dem Präpariermikroskop mit zwei sterilen Pinzetten Blutgerinnsel und eventuell vorhandene mütterliche Decidua vom Zottenmaterial entfernen. Zottenmaterial ist hell gefärbt, schlauchförmig und/oder klumpig mit sichtbaren Verästelungen und Venen.
4. Die gereinigten Zotten in eine andere Petrischale mit vorgewärmtem CHANG Amnio-Komplettmedium überführen. Eine abschließende Reinigung durchführen; dazu die Zotten mit einer Pinzette greifen und behutsam hin- und herbewegen. Hinweis: Die ideale Gebrauchsmenge pro Kultur ist 5 mg. Darauf achten, die empfindlichen Zotten nicht zu beschädigen.
5. Zotten und Medium in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführen und 4 Tropfen Antibiotikum (d. h. Gentamicinsulfat, 50 µl/ml) in das Zentrifugenröhrchen geben. 30 Minuten lang stehen lassen.
6. Die Zotten 5 Minuten bei ca. 1.400 U/min zentrifugieren.

Chorionzotten-Probenkultur:

1. So viel Überstand vom zentrifugierten Röhrchen absaugen, dass 0,5 ml Medium über dem Zellpellet (oder etwa das 2-fache Volumen des Pellets) verbleiben.
2. Das Pellet vorsichtig resuspendieren. 2 ml vorgewärmtes CHANG Amnio-Medium in das Zentrifugenröhrchen geben.
3. 2 ml Trypsin EDTA zugeben und die Kultur ungestört 10 Minuten bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren. Das Röhrchen aus dem Inkubator nehmen, das Pellet resuspendieren und für weitere 10 Minuten in den Inkubator stellen.
4. Das Zentrifugenröhrchen aus dem Inkubator nehmen, Pellet resuspendieren und 8–10 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugieren.
5. Überstand vom zentrifugierten Röhrchen absaugen. Pellet resuspendieren, dann 1 ml Kollagenase in das Röhrchen geben und 5 Minuten in den Inkubator stellen.
6. Aus dem Inkubator nehmen und visuell prüfen, ob das Pellet trüb ist und keine einzelnen Stücke individueller Zotten sichtbar sind. Wenn das Pellet nicht trüb ist, für weitere 5 Minuten in den Inkubator stellen.
7. 3 ml vorgewärmtes CHANG Amnio in das Zentrifugenröhrchen geben, um die Wirkung der Kollagenase zu stoppen.

8. Das Röhrchen 8–10 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugieren.
9. So viel Überstand vom zentrifugierten Röhrchen absaugen, dass 0,5 ml Medium über dem Zellpellet verbleiben. Das Pellet vor der Zugabe von CHANG Amnio zur Vorbereitung resuspendieren.
10. Eine optimale Anzahl Kulturen mit 0,5 ml CHANG Amnio pro Kultur für jede Petrischale mit Deckglas ansetzen.
11. Die Kulturen ungestört bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren.
12. Die Kulturen an Tag 2 durch Zugabe von 1,5 ml vorgewärmtem CHANG Amnio überspülen.
13. Nach 4 Tagen sollten die Kulturen auf Wachstum überprüft werden. Wenn Wachstum beobachtet wird, das Medium entfernen und 2 ml frisches vorgewärmtes CHANG Amnio auf jedes Deckglas geben. Die Kulturen sollten danach alle 2 Tage genährt werden. Bei Proben mit hohem Blutgehalt können Kulturen häufigere Medienwechsel erfordern.
14. An Tag 5 die Kulturen auf Wachstum prüfen und entnehmen, wenn ausreichend Kolonien vorhanden sind. Die besten Ergebnisse werden erreicht, wenn die Kulturen am Tag vor der Entnahme mit CHANG Amnio genährt werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Tiefgekühlt unter -10 °C lagern. Bei Tiefkühlagerung ist das Produkt bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Unbenutzte Produkte können in Arbeitsaliquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren oder fest verschlossen und bei 2 °C bis 8 °C bis zu 30 Tage gelagert werden. Sie können maximal zweimal aufgetaut 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. Keine Flaschen verwenden, deren Sterilverpackung beschädigt wurde. CHANG Amnio nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

ITALIANO

INDICAZIONI PER L'USO

CHANG Amnio con gentamicina e L-glutamina può essere usato per le seguenti applicazioni:

1. colture primarie di cellule di liquido amniotico;
2. colture secondarie di cellule di liquido amniotico;
3. tessuto amniotico solido da prelievo dei villi coriali.

Questo terreno può essere usato in incubatori con CO₂ (colture equilibrate con atmosfera al 5-8% di CO₂).

Il pH finale deve essere compreso fra 6,65 e 7,44. Vedere le istruzioni per l'uso.

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

CHANG Amnio è un terreno completo pronto all'uso, formulato per la coltura primaria di cellule di liquido amniotico (AFC) umano, prelievo dei villi coriali (CVS) e prodotti del concepimento (POC), per la determinazione del cariotipo e altri test genetici prenatali. È stato ottimizzato per metodologie sia in fiasca che in situ. Questo prodotto contiene l'antibiotico gentamicina solfato (50 µg/ml).

COMPONENTI	
Tamponi	Proteine, ormoni e fattori di crescita
Bicarbonato di sodio	Acidi nucleici
	Desossiadenosina
	Desossicitidina
	Desossiguanosina
	Adenosina
	Citidina
	Guanosina
	Timidina
	Uridina
Antiossidante	Altro
Acido tiotico	Alcol etilico
	Tirina
Antibiotico	Vitamine ed elementi in tracce
Gentamicina solfato	Acido ascorbico
	Acido folico
	Nicotinamide
	Riboflavina
	Tiamina
	Acido pantotenico
Aminocidi	Cobalamina
Alanina	Piridossina
Arginina	Biotina
Asparagina	
Acido aspartico	Sal e ioni
Cisteina	Cloruro di sodio
Acido glutammico	Selenito di sodio
Glutammina	Cloruro di calcio
Glicina	Cloruro di colina
Istidina	Cloruro di potassio
Isoleucina	Fosfato di potassio
Leucina	Solfato di magnesio
Lisina	Valina
Metionina	
Fenilalanina	
Prolina	
Serina	
Treonina	
Triptofano	
Tirosina	
Valina	

GARANZIA DI QUALITÀ

STERILITÀ

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

PREPARAZIONE PER L'USO

Scongela il terreno su un banco sterile a temperatura ambiente o immergendo il flacone in un bagno d'acqua a 37 °C.

CHANG Amnio contiene gentamicina (50 mg/l). È possibile aggiungere ulteriori antibiotici, se lo si ritiene necessario.

SUDDIVISIONE DI CHANG Amnio IN ALIQUOTE

1. Scongelaire CHANG Amnio seguendo le istruzioni di cui sopra.
2. Distribuire in condizioni asettiche in aliquote di dimensioni appropriate e ricongelare.
3. Scongelaire le aliquote in bagno d'acqua a 37 °C quando si è pronti a usarle.

ISTRUZIONI PER L'USO

Uso di CHANG Amnio per colture primarie: metodologie *in situ*

1. Centrifugare il liquido amniotico a circa 1.200 giri/min per 10 minuti per concentrare le cellule.
2. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata, lasciando circa 0,5 ml di liquido amniotico centrifugato sopra il pellet cellulare (o circa 2 volte il volume di pellet). Qualora necessario, distribuire il surnatante (almeno 1 ml, se possibile) per i dosaggi di alfa-fetoproteina (AFP) e acetilcolinesterasi. Se il campione contiene tracce di sangue, preparare un'aliquota aggiuntiva per ulteriori esami. Rispondere il pellet

cellulare in una piccola quantità di liquido amniotico della paziente. Aggiungere alla sospensione di cellule concentrata una quantità di CHANG Amnio sufficiente a ottenere un volume finale nella piastra di 0,5 ml per ciascun vetrino coprioggetti (totale di 4 vetrini coprioggetti, secondo la quantità di pellet cellulare) o 2 ml per ciascuna minifiasca. Se il campione proviene da una paziente al terzo trimestre di gravidanza, il pellet potrebbe essere di dimensioni maggiori ma contenere una minore quantità di cellule vitali, quindi richiederà una semina più abbondante (minore terreno del normale).

3. Incubare le colture indisturbate a 37 °C in atmosfera al 5-8% di CO₂.
4. Al giorno 2, aggiungere alle colture 2 ml di CHANG Amnio.
5. Dopo 4-5 giorni, verificare la crescita delle colture e arricchirle non appena si osserva una crescita. Arricchire le colture rimuovendo tutto il surnatante e sostituendolo con 2 ml di CHANG Amnio fresco. Successivamente, si raccomanda di arricchire le colture ogni 2 giorni. Per i campioni con tracce di sangue, potrebbe essere necessario cambiare il terreno più di frequente.
6. Controllare la crescita delle colture a partire dal giorno 5 e raccogliere quando si osservano sufficienti colonie.
7. I risultati migliori si ottengono quando le colture sono arricchite con CHANG Amnio il giorno prima della raccolta.

Uso di CHANG Amnio per colture primarie: metodologie *in fiasca*

1. Centrifugare il liquido amniotico a circa 1.200 giri/min per 10 minuti per concentrare le cellule.
2. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata, lasciando circa 0,5 ml di liquido amniotico centrifugato sopra il pellet cellulare (o circa 2 volte il volume di pellet). Qualora necessario, distribuire il surnatante (almeno 1 ml, se possibile) per i dosaggi di alfa-fetoproteina (AFP) e acetilcolinesterasi. Se il campione contiene tracce di sangue, preparare un'aliquota aggiuntiva per ulteriori esami. Rispondere il pellet cellulare in una piccola quantità di liquido amniotico della paziente. Aggiungere 4 ml di CHANG Amnio per raggiungere un volume totale di 5 ml per fiasca. Se il campione proviene da una paziente al terzo trimestre di gravidanza, il pellet potrebbe essere di dimensioni maggiori ma contenere una minore quantità di cellule vitali, quindi richiederà una semina più abbondante (minore terreno del normale).
3. Incubare le colture indisturbate a 37 °C in atmosfera al 5-8% di CO₂.
4. Verificare la crescita al giorno 5. Sostituire il terreno con 2 ml di CHANG Amnio fresco e raccogliere se si osserva una crescita cellulare sufficiente.
5. Verificare la crescita delle colture e successivamente sostituire completamente il terreno ogni giorno finché non si osservano colonie sufficienti e pronte per la raccolta. Per i campioni con tracce di sangue, potrebbe essere necessario cambiare il terreno più di frequente.
6. I risultati migliori si ottengono quando le colture sono arricchite con CHANG Amnio il giorno prima della raccolta.

Uso di CHANG Amnio per colture secondarie di cellule di liquido amniotico

Per eseguire colture cellulari secondarie, trattare le colture con tripsina (o pronase ecc.) come nel caso di cellule in coltura in terreno convenzionale. In ogni caso, il trattamento con proteasi deve essere monitorato accuratamente. Le cellule di liquido amniotico coltivate in CHANG Amnio sono generalmente più sensibili al trattamento con proteasi di quelle coltivate in terreno convenzionale. In ragione di ciò, potrebbe essere necessario modificare il protocollo.

Nota – Il pH del terreno usato per arricchire le colture deve essere compreso tra 6,65 e 7,44 (cioè, il terreno deve essere di colore salmone leggermente tendente al giallo). Il pH può essere regolato facilmente ponendo il terreno in un incubatore con CO₂ al 5-8% con il tappo leggermente svitato per circa 30 minuti.

Nota – Nella fase di scongelamento di Chang Amnio si possono formare alcuni precipitati proteici e di ossalato di calcio, che non hanno alcun effetto noto sulle prestazioni del prodotto.

Preparazione di un campione di villi coriali

1. Etichettare una piastra di Petri per ciascun campione utilizzato e trasferire il contenuto del campione in modo asettico. Aggiungere alla piastra 5 ml di terreno completo CHANG Amnio preriscaldato e collocarla

- in un incubatore per 30 minuti, a 35-39 °C in un'atmosfera al 5-8% di CO₂, per consentire al sangue di depositarsi sul fondo.
2. Pulire il campione impiegando un microscopio stereoscopico, inizialmente con ingrandimento di 1,5x e poi regolando l'ingrandimento a circa 3x. Nota – Occorrono circa 20 - 40 mg di campione di villi coriali.
3. Con due pinze sterili e continuando a tenere la piastra sotto il microscopio stereoscopico, rimuovere i coaguli di sangue ed eventuale tessuto materno deciduo dai villi coriali, che si presentano di colore tenue, tubolari e/o grumosi, visibilmente ramificati e vascolarizzati.
4. Trasferire i villi puliti su un'altra piastra di Petri contenente terreno completo CHANG Amnio preriscaldato. Eseguire una pulizia finale afferandoli con pinze e scuotendoli delicatamente. Nota – La quantità ideale da usare per la coltura è di 5 mg. Prestare attenzione a non danneggiare i villi, particolarmente fragili.
5. Trasferire i villi e il terreno in una provetta per centrifuga da 15 ml e aggiungere alla stessa 4 gocce di antibiotico (ossia, gentamicina solfato, 50 µl/ml). Lasciare riposare per 30 minuti.
6. Centrifugare i villi a circa 1.400 giri/min per 5 minuti.

Coltura di un campione di villi coriali

1. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata, accertandosi di lasciare 0,5 ml di terreno sopra il pellet cellulare (o circa 2 volte il volume di pellet).
2. Rispondere delicatamente il pellet. Aggiungere 2 ml di terreno CHANG preriscaldato alla provetta per centrifuga.
3. Aggiungere 2 ml di tripsina-EDTA e incubare la coltura indisturbata a 35-39 °C in atmosfera al 5-8% di CO₂ per 10 minuti. Rimuovere la provetta dall'incubatore, rispondere il pellet e porre in incubatore per altri 10 minuti.
4. Rimuovere la provetta dall'incubatore, rispondere il pellet e centrifugare per 8-10 minuti a 1.400 giri/min.
5. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata. Rispondere il pellet, quindi aggiungere 1 ml di collagenasi alla provetta e porre in incubatore per 5 minuti.
6. Rimuovere dall'incubatore e verificare visivamente se il pellet si presenta torbido e non sono visibili frammenti singoli e distinti di villi. Se il pellet non si presenta torbido, rimettere in incubatore per altri 5 minuti.
7. Aggiungere 3 ml di CHANG Amnio preriscaldato alla provetta per centrifuga per interrompere l'attività della collagenasi.
8. Centrifugare per 8-10 minuti a 1.400 giri/min.
9. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata, lasciando 0,5 ml di terreno sopra il pellet. Sospendere nuovamente il pellet prima di aggiungere il CHANG Amnio usato per la preparazione.
10. Preparare il numero ottimale di colture utilizzando 0,5 ml di CHANG Amnio per colture per ciascuna piastra di Petri contenente un vetrino coprioggetti.
11. Incubare le colture indisturbate a 35-39 °C in atmosfera al 5-8% di CO₂.
12. Al giorno 2, aggiungere alle colture 1,5 ml di CHANG Amnio preriscaldato.
13. Al giorno 4, verificare la crescita delle colture. Se si osserva una crescita, rimuovere il terreno e aggiungere 2 ml di CHANG Amnio preriscaldato appena preparato a ogni vetrino coprioggetti. Successivamente, le colture dovranno essere arricchite ogni 2 giorni. Per i campioni con tracce di sangue, potrebbe essere necessario cambiare il terreno più di frequente.
14. Controllare la crescita delle colture al giorno 5 e raccogliere quando si osservano sufficienti colonie. I risultati migliori si ottengono quando le colture sono arricchite con CHANG Amnio il giorno prima della raccolta.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare congelato a temperatura inferiore a -10 °C. Se conservato congelato, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone. 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; ricongelare non oltre due volte. 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. Non usare flaconi la cui confezione sterile sia stata compromessa.

Non utilizzare CHANG Amnio dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

ESPAÑOL

INDICACIÓN DE USO

El CHANG Amnio con gentamicina y L-glutamina se puede usar para estas aplicaciones:

- cultivo primario de células de líquido amniótico;
- expansión de células de líquido amniótico subcultivadas;
- tejido amniótico sólido (muestreo de vellosidades coriónicas).

Este medio se ha diseñado para su uso en incubadoras de CO₂ (cultivos equilibrados en una atmósfera con 5-8 % de CO₂).

El pH final debe ser de 6,65-7,44. Consultar las instrucciones de uso.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El CHANG Amnio es un medio completo y listo para usar para el cultivo primario de células del líquido amniótico humano (AFC), muestreo de vellosidades coriónicas (CVS) y productos de la concepción (POC) que se utilizan en el cariotipado y otras pruebas genéticas prenatales. Esta fórmula se ha optimizado para los métodos de frascos e *in situ*. Este producto contiene el antibiótico sulfato de gentamicina (50 µg/ml).

COMPONENTES		
Sistemas tampón	<u>Proteínas, hormonas y factores de crecimiento</u>	Fosfato potásico
		Sulfato magnésico
Bicarbonato sódico		Fosfato sódico
Antioxidante	Suero bovino fetal (FBS)	<u>Ácidos nucleicos</u>
Ácido tiótico	Suero bovino neonatal	Desoxiadenosina
<u>Antibiótico</u>	Transferirina humana	Desoxicitidina
	Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	Desoxiguanosina
Sulfato de gentamicina	Insulina	Adenosina
	Progesterona	Citidina
<u>Aminocácidos</u>	Testosterona	Guanosina
	Beta-estradiol	Timidina
Alanina	Hidrocoritsona	Uridina
Arginina		
Asparagina		<u>Otros</u>
Ácido aspártico		Alcohol etílico
Cisteína		Tironina
Ácido glutámico		
Glutamina		
Glicina	<u>Indicador del pH</u>	<u>Vitaminas y oligoelementos</u>
Histidina	Rojo de fenol	Ácido ascórbico
Isoleucina		Ácido fólico
Leucina	<u>Sustratos energéticos</u>	Nicotinamida
Lisina	Glucosa	Riboflavina
Metionina	Piruvato	Tiamina
Fenilalanina	Inositol	Ácido pantoténico
Prolina		Cobalamina
Serina		Príndoxina
Treonina	<u>Salas e iones</u>	Biotina
Triptófano	Cloruro sódico	
Tirosina	Selenito sódico	
Valina	Cloruro cálcico	<u>Agua</u>
	Cloruro de colina	Calidad de agua para inyectables
	Cloruro potásico	

GARANTÍA DE CALIDAD

ESTERILIDAD

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

PREPARACIÓN PARA EL USO

Descongelar sobre una superficie estéril a temperatura ambiente o colocando el frasco en un baño de agua a 37 °C.

El CHANG Amnio contiene gentamicina (50 mg/L). Se pueden añadir antibióticos si se desea.

DIVIDIR EN ALÍCUOTAS EL CHANG Amnio

- Descongelar el CHANG Amnio según las instrucciones anteriores.
- Repartir en alícuotas de tamaño adecuado en condiciones asépticas y volver a congelar.
- Descongelar las alícuotas en un baño de agua a 37 °C cuando estén listas para su uso.

INSTRUCCIONES DE USO

Uso del CHANG Amnio para cultivos primarios: métodos *in situ*

- Centrifugar el líquido amniótico a unos 1200 rpm durante 10 minutos para concentrar las células.
- Aspirar el sobrenadante del tubo centrifugado, dejando aproximadamente 0,5 ml por encima del sedimento celular (o aproximadamente 2 veces el volumen de sedimento) del líquido amniótico centrifugado. Repartir el sobrenadante en alícuotas (de al menos 1 ml, si es posible) para analizar la alfafetoproteína (AFP) y la acetilcolinesterasa, si es necesario. Si se recoge una muestra sanguinolenta, preparar una alícuota adicional para más pruebas. Resuspender el sedimento celular en un pequeño volumen del propio líquido amniótico de la paciente. Añadir suficiente CHANG Amnio a la suspensión celular concentrada para disponer de un volumen final de siembra de 0,5 ml por cubreobjetos (en total, 4 cubreobjetos en función del volumen del sedimento celular) o 2 ml por frasco. Si se recibe una muestra de una paciente en el tercer trimestre de embarazo, el sedimento puede ser mayor pero contener células menos viables, así que se requiere una siembra más intensa (menos medio que habitualmente).
- Incubar los cultivos sin perturbaciones a 37 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO₂.
- Inundar los cultivos el día 2 añadiendo 2 ml de CHANG Amnio.
- Al cabo de 4 a 5 días, se revisará el crecimiento de los cultivos. Los cultivos se alimentarán una vez que se haya observado su crecimiento. Alimentar los cultivos aspirando todo el sobrenadante del cultivo y sustituyéndolo por 2 ml de CHANG Amnio fresco. Se recomienda alimentar los cultivos cada 2 días a partir de entonces. En caso de muestras sanguinolentas, los cultivos pueden requerir cambios más frecuentes de los medios.
- Comprobar el crecimiento de los cultivos a partir del día 5 y cosecharlos cuando se observen suficientes colonias.
- Los mejores resultados se obtienen cuando los cultivos se alimentan con el CHANG Amnio el día antes de la cosecha.

Uso del CHANG Amnio para cultivos primarios: Métodos de frasco

- Centrifugar el líquido amniótico a unos 1200 rpm durante 10 minutos para concentrar las células.
- Aspirar el sobrenadante del tubo centrifugado, dejando aproximadamente 0,5 ml por encima del sedimento celular (o aproximadamente 2 veces el volumen de sedimento) del líquido amniótico centrifugado. Repartir el sobrenadante en alícuotas (de al menos 1 ml, si es posible) para analizar la alfafetoproteína (AFP) y la acetilcolinesterasa, si es necesario. Si se recoge una muestra sanguinolenta, preparar una alícuota adicional para más pruebas. Resuspender el sedimento celular en un pequeño volumen del propio líquido amniótico de la paciente. Añadir 4 ml de CHANG Amnio hasta un volumen total de 5 ml por frasco. Si se recibe una muestra de una paciente en el tercer trimestre de embarazo, el sedimento puede ser mayor pero contener células menos viables, así que se requiere una siembra más intensa (menos medio que habitualmente).
- Incubar los cultivos sin perturbaciones a 37 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO₂.
- Comprobar el crecimiento en el día 5. Cambiar el medio por 2 ml del CHANG Amnio fresco y cosechar si se observa un crecimiento celular suficiente.
- Comprobar el crecimiento de los cultivos y luego renovar por completo el medio cada día hasta que las colonias alcancen un número suficiente y estén listas para la cosecha. En caso de muestras sanguinolentas, los cultivos pueden requerir cambios más frecuentes de los medios.
- Los mejores resultados se obtienen cuando los cultivos se alimentan con el CHANG Amnio el día antes de la cosecha.

Uso del CHANG Amnio para la expansión de células de líquido amniótico subcultivadas:

Para subcultivar las células, tratar los cultivos con tripsina (o pronasa, etc.) como lo haría si las células crecieran en un medio convencional. De cualquier manera, el tratamiento con proteasa debe vigilarse con cuidado. Las células de líquido amniótico expandidas en el CHANG Amnio tienden a ser más sensibles al tratamiento con proteasa que cuando se cultivan en un medio convencional. Es posible que deba modificar el protocolo por esta razón.

Nota: El pH del medio utilizado para alimentar los cultivos debe situarse entre 6,65 y 7,44 (es decir, el medio debe tener un color salmón amarillento). El pH se puede ajustar con facilidad colocando el medio (con el tapón ligeramente aflojado) en una incubadora con 5-8 % de CO₂ durante unos 30 minutos.

Nota: Al descongelar el Chang Amnio puede formarse oxalato de calcio y precipitado proteico. Este precipitado no tiene ningún efecto conocido en el rendimiento del producto.

Preparación de la muestra de vellosidades coriónicas:

- Etiquete una placa de Petri por cada muestra que reciba y transfiera asepticamente el contenido de la muestra. Añada a la placa 5 ml de medio completo CHANG Amnio precalentado y métaela en una incubadora durante 30 minutos a 35-39 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO₂ para que se sedimente la sangre.
- Limpie la muestra con un microscopio de disección, primero a 1,5 aumentos y luego ajustando a 3 aumentos. Nota: Necesitará una muestra de 20-40 mg de vellosidades coriónicas.
- Con dos pinzas estériles, extraer los coágulos de sangre y cualquier decidua materna presente en las vellosidades coriónicas trabajando siempre dentro de la placa y bajo el microscopio de disección. El material de las vellosidades es de color claro, aspecto tubular y/o grumoso y presentará ramificaciones y venas visibles.
- Transferir las vellosidades limpias a otra placa de Petri que contenga medio completo CHANG Amnio precalentado. Realizar una limpieza final, utilizando pinzas para agarrar las vellosidades y agitar con suavidad. Nota: 5 mg es la cantidad ideal por cultivo. Procurar no dañar las vellosidades frágiles.
- Transferir las vellosidades y los medios a un tubo de centrifuga de 15 ml y añadir 4 gotas de antibiótico (p. ej., sulfato de gentamicina, 50 µl/ml) al tubo de centrifuga. Dejar reposar durante 30 minutos.
- Centrifugar las vellosidades a unos 1400 rpm durante 5 minutos.

Cultivo de la muestra de vellosidades coriónicas:

- Aspirar el sobrenadante del tubo de centrifuga asegurándose de dejar aproximadamente 0,5 ml de los medios por encima del sedimento celular (o aproximadamente 2 veces el volumen de sedimento).
- Resuspender con suavidad el sedimento. Añadir 2 ml de los medios CHANG Amnio precalentados al tubo de centrifuga.
- Añadir 2 ml de tripsina-EDTA e incubar el cultivo sin perturbaciones a 35-39 °C, en una atmósfera con un 5-8 % de CO₂ durante 10 minutos. Sacar el tubo de la incubadora, resuspender el sedimento e introducirlo en la incubadora durante 10 minutos más.
- Sacar el tubo de centrifuga de la incubadora, resuspender el sedimento y centrifugar durante 8-10 minutos a 1400 rpm.
- Aspirar el sobrenadante del tubo de centrifuga. Resuspender el sedimento, luego añadir 1 ml de colagenasa al tubo e introducirlo en la incubadora durante 5 minutos.
- Sacar de la incubadora y realizar una inspección visual para comprobar si el sedimento está turbio y no se visualizan fragmentos nítidos de vellosidades individuales. Si el sedimento no está turbio, introducirlo de nuevo en la incubadora durante 5 minutos más.

- Añadir 3 ml del CHANG Amnio precalentado al tubo de centrifuga para detener la acción de la colagenasa.
- Centrifugar el tubo durante 8-10 minutos a 1400 rpm.
- Aspirar el sobrenadante del tubo de centrifuga, dejando aproximadamente 0,5 ml de los medios por encima del sedimento celular. Resuspender el sedimento antes de añadir el CHANG Amnio utilizado para la preparación.
- Preparar un número óptimo de cultivos utilizando 0,5 ml del CHANG Amnio por cultivo para cada placa de Petri que contenga un cubreobjetos.
- Incubar los cultivos sin perturbaciones a 35-39 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO₂.
- Inundar los cultivos el día 2 añadiendo 1,5 ml de CHANG Amnio precalentado.
- Al cabo de 4 días, se revisará el crecimiento de los cultivos. Si se observa crecimiento, retirar los medios y añadir 2 ml del CHANG Amnio fresco y precalentado a cada cubreobjetos. Los cultivos se deben alimentar cada 2 días a partir de entonces. En caso de muestras sanguinolentas, los cultivos pueden requerir cambios más frecuentes de los medios.
- Comprobar el crecimiento de los cultivos el día 5 y cosecharlos cuando se observen suficientes colonias. Los mejores resultados se obtienen cuando los cultivos se alimentan con el CHANG Amnio el día antes de la cosecha.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Si se conserva congelado a -10 °C, el producto se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El producto sobrante no utilizado puede dispensarse en porciones alícuotas de trabajo y volver a congelarse para su uso posterior, o bien cerrarse herméticamente y conservarse a 2-8 °C durante 30 días como máximo; se puede congelar dos veces como máximo. Proteger de la luz fluorescente.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Este producto lo debe utilizar personal con formación en procedimientos que incluyen el uso previsto del producto. No usar frascos en los que el envase estéril esté dañado. No utilizar el CHANG Amnio más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

FRANÇAIS

INDICATION D'UTILISATION

CHANG Amnio avec gentamicine et glutamine L peut être utilisé pour les applications suivantes :

- La culture primaire des cellules du liquide amniotique ;
- Le repiquage des cellules du liquide amniotique ;
- La culture des tissus des prélèvements de villosités choriales de la membrane amniotique.

Ce milieu a été conçu pour être utilisé dans des incubateurs à CO₂ (cultures équilibrées dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂).

Le pH final doit se situer entre 6,65 et 7,44. Prière de lire le mode d'emploi.

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

CHANG Amnio est un milieu complet prêt à l'emploi pour la culture primaire des cellules de liquide amniotique humain, des prélèvements de villosités choriales et des produits de conception lors du caryotypage et des autres tests de diagnostic génétique prénatal. Il a été optimisé pour les méthodes de culture en flacons et *in situ*. Ce milieu contient 50 µg/ml de sulfate de gentamicine (antibiotique).

COMPOSANTS

Tamppons	Protéines, hormones et facteurs de croissance	Phosphate de potassium
Bicarbonate de sodium	Sulfate de magnésium	Sulfate de magnésium
Antioxydant	Phosphate de sodium	Phosphate de sodium
Acide thiocétique		
Antibiotique	Sérum de veau fœtal (SVF)	Acides nucléiques
	Sérum de veau naissant	Désoxyadénosine
Sulfate de gentamicine	Transferrine humaine	Désoxycytidine
	Facteur de croissance des fibroblastes	Désoxyguanosine
Acides aminés	Adénosine	Adénosine
Alanine	Cytidine	Cytidine
Arginine	Guanosine	Guanosine
Asparagine	Thymidine	Thymidine
Acide aspartique	Uridine	Uridine
Cystéine		
Acide glutamique	Autre	Autre
Glutamine	Alcool éthylique	Alcool éthylique
Glycine	Thyronine	Thyronine
Histidine		
Isoleucine	Vitamines et oligo-éléments	Vitamines et oligo-éléments
Leucine	Acide ascorbique	Acide ascorbique
Lysine	Acide folique	Acide folique
Méthionine	Nicotinamide	Nicotinamide
Phénylalanine	Pyruvate	Pyruvate
Proline	Inositol	Inositol
Sérine		
Thréonine	Sels et ions	Sels et ions
Tryptophane	Chlorure de sodium	Chlorure de sodium
Tyrosine	Sélanite de sodium	Cobalamine
Valine	Chlorure de calcium	Pyridoxine
	Chlorure de choline	Biotine
	Chlorure de potassium	
	Eau	Eau
	Qualité WFI	Qualité WFI

ASSURANCE QUALITÉ

STÉRILITÉ

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

PRÉPARATION

Décongeler sur un plan de travail stérile à température ambiante ou en plaçant le flacon dans un bain-marie à 37 °C.

CHANG Amnio contient du sulfate de gentamicine (50 mg/l). D'autres antibiotiques peuvent également être ajoutés, le cas échéant.

PRÉPARATION D'ALIQUOTES DE CHANG Amino

- Décongeler CHANG Amnio en suivant les instructions ci-dessus.
- Répartir stérilement en plusieurs aliquotes de taille appropriée et recongeler.
- Décongeler les aliquotes dans un bain-marie à 37 °C lorsqu'elles sont prêtes à être utilisées.

MODE D'EMPLOI

Utilisation de CHANG Amnio pour les cultures primaires : méthodes *in situ*

- Centrifuger le liquide amniotique à environ 1 200 tr/min pendant 10 minutes pour concentrer les cellules.
- Aspirer le surnageant du tube centrifugé, en laissant environ 0,5 ml au-dessus du culot de cellules (ou environ deux fois le volume du culot) de liquide amniotique centrifugé. Prélever le surnageant (au moins 1 ml, si possible) pour les essais d'alpha-fœtoprotéine (AFP) et d'acétylcholinestérase, si nécessaire. Si l'échantillon contient du sang, préparer une aliquote supplémentaire pour de nouveaux tests. Remettre le culot cellulaire en suspension dans un petit volume du liquide amniotique de la patiente. Ajouter suffisamment de CHANG Amnio à la suspension concentrée des cellules pour obtenir un volume final nécessaire pour 4 lamelles (0,5 ml par lamelle), suivant la taille du culot de cellules, ou 2 ml par petit flacon de culture. Si l'échantillon provient d'une patiente au cours du troisième trimestre de la grossesse, le culot peut être plus important mais contenir moins de cellules viables, requérant ainsi un ensemencement plus intense (moins de milieux que normalement).
- Incuber les cultures sans agitation à 37 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂.
- Inonder les cultures le deuxième jour en ajoutant 2 ml de CHANG Amnio.
- Au bout de 4 à 5 jours, vérifier la croissance des cultures. Dès qu'une croissance est observée, alimenter les cultures en retirant le surnageant et en le remplaçant par 2 ml de CHANG Amnio frais. Il est recommandé d'alimenter les cultures tous les 2 jours par la suite. Pour les échantillons contenant du sang, les cultures peuvent nécessiter des changements de milieu plus fréquents.
- Vérifier la croissance des cultures à partir du cinquième jour et procéder à la collecte lorsque les cultures ont des colonies de taille suffisante.
- Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les cultures sont alimentées avec CHANG Amnio la veille de la collecte.

Utilisation de CHANG Amnio pour les cultures primaires : méthodes de culture en flacons

- Centrifuger le liquide amniotique à environ 1 200 tr/min pendant 10 minutes pour concentrer les cellules.
- Aspirer le surnageant du tube centrifugé, en laissant environ 0,5 ml au-dessus du culot de cellules (ou environ deux fois le volume du culot) de liquide amniotique centrifugé. Prélever le surnageant (au moins 1 ml, si possible) pour les essais d'alpha-fœtoprotéine (AFP) et d'acétylcholinestérase, si nécessaire. Si l'échantillon contient du sang, préparer une aliquote supplémentaire pour de nouveaux tests. Remettre le culot cellulaire en suspension dans un petit volume du liquide amniotique de la patiente. Ajouter 4 ml de CHANG Amnio pour obtenir un volume total de 5 ml par flacon. Si l'échantillon provient d'une patiente au cours du troisième trimestre de la grossesse, le culot peut être plus important mais contenir moins de cellules viables, requérant ainsi un ensemencement plus intense (moins de milieux que normalement).
- Incuber les cultures sans agitation à 37 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂.
- Vérifier la croissance des cultures le cinquième jour. Changer le milieu avec 2 ml de CHANG Amnio frais et procéder à la collecte lorsqu'une croissance suffisante des cellules est observée.

- Examiner la croissance et changer complètement le milieu tous les jours jusqu'à ce que le nombre des colonies soit suffisant pour la collecte. Pour les échantillons contenant du sang, les cultures peuvent nécessiter des changements de milieu plus fréquents.
- Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les cultures sont alimentées avec CHANG Amnio la veille de la collecte.

Utilisation de CHANG Amnio pour le repiquage des cellules du liquide amniotique :

Pour repiquer les cellules, traiter les cultures avec de la trypsrine (ou de la pronase, etc.) comme vous le faites normalement lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu conventionnel. Le traitement avec des protéases doit cependant être surveillé avec prudence. Les cellules du liquide amniotique cultivées dans du CHANG Amnio ont tendance à être plus sensibles au traitement protéasique que celles cultivées dans un milieu traditionnel. Il peut être nécessaire de modifier le protocole en conséquence.

Remarque : le pH du milieu utilisé pour alimenter les cultures doit se situer entre 6,65 et 7,44 (c.-à-d. le milieu doit être de couleur légèrement saumon-jaunâtre). Le pH peut facilement être ajusté en plaçant le milieu dans un incubateur contenant entre 5 et 8 % de CO₂ avec le bouchon légèrement desserré pendant environ 30 minutes.

Remarque : Chang Amnio peut produire des précipités d'oxalate de calcium et de protéines lors de la décongélation. Ces précipités n'ont pas d'effet connu sur les performances du produit.

Préparation des échantillons de villosités choriales :

- Étiqueter une boîte de Petri pour chaque échantillon prélevé et transférer le contenu de l'échantillon de façon aseptique. Ajouter 5 ml du milieu complet de CHANG Amnio préchauffé à la boîte et placer dans un incubateur pendant 30 minutes entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂ pour laisser le sang se déposer.
- Nettoyer l'échantillon à l'aide d'un microscope de dissection, initialement avec un grossissement de 1,5, puis en ajustant sur un grossissement avoisinant 3. Remarque : environ 20 à 40 mg d'échantillon de villosités choriales sont requis.
- À l'aide de deux paires de pinces stériles, retirer les caillots sanguins et toute caduque maternelle du matériel de villosité tout en travaillant dans la boîte sous le microscope de dissection. Le matériel de villosité est de couleur claire, tubulaire et/ou grumeleux avec des branches et des veines visibles.
- Transférer les villosités propres dans une autre boîte de Petri contenant le milieu complet de CHANG Amnio préchauffé. Procéder au nettoyage final en utilisant des pinces pour saisir les villosités et agiter délicatement. Remarque : la quantité idéale à utiliser par culture est de 5 mg. Éviter d'endommager les villosités fragiles.
- Transférer les villosités et le milieu dans un tube à centrifuger de 15 ml et ajouter 4 gouttes d'antibiotique (c.-à-d. sulfate de gentamicine, 50 µl/ml) au tube à centrifuger. Laisser reposer pendant 30 minutes.
- Centrifuger les villosités à environ 1 400 tr/min pendant 5 minutes.

Culture des échantillons de villosités choriales :

- Aspirer le surnageant du tube centrifugé en veillant à laisser 0,5 ml de milieu au-dessus du culot de cellules (ou environ 2 fois le volume du culot).
- Remettre délicatement le culot en suspension. Ajouter 2 ml de milieu de CHANG Amnio préchauffé au tube à centrifuger.
- Ajouter 2 ml de trypsrine EDTA et incuber la culture sans agitation entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂ pendant 10 minutes. Sortir le tube de l'étuve, remettre le culot en suspension et le placer dans l'étuve pendant 10 minutes supplémentaires.
- Sortir le tube à centrifuger de l'incubateur, remettre le culot en suspension et centrifuger pendant 8 à 10 minutes à 1 400 tr/min.

- Aspirer le surnageant du tube à centrifuger. Remettre le culot en suspension, puis ajouter 1 ml de collagénase au tube et le placer dans l'étuve pendant 5 minutes.
- Retirer de l'incubateur et vérifier visuellement si le culot est trouble et si aucun fragment individuel de villosité n'est visible. Si le culot n'est pas trouble, le remettre dans l'incubateur pendant 5 minutes supplémentaires.
- Ajouter 3 ml de CHANG Amnio préchauffé au tube à centrifuger pour arrêter l'action de la collagénase.
- Centrifuger le tube pendant 8 à 10 minutes à 1 400 tr/min.
- Aspirer le surnageant du tube centrifugé en laissant 0,5 ml de milieu au-dessus du culot de cellules. Remettre le culot en suspension avant d'ajouter CHANG Amnio utilisé pour la préparation.
- Préparer un nombre optimal de cultures avec 0,5 ml de CHANG Amnio par culture pour chaque boîte de Petri contenant une lamelle.
- Incuber les cultures sans agitation entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO₂.
- Inonder les cultures le jour 2 en ajoutant 1,5 ml de CHANG Amnio préchauffé.
- Au bout de 4 jours, vérifier la croissance des cultures. Si une croissance est observée, retirer le milieu et ajouter 2 ml de CHANG Amnio préchauffé frais à chaque lamelle. Les cultures doivent être alimentées tous les 2 jours par la suite. Pour les échantillons contenant du sang, les cultures peuvent nécessiter des changements de milieu plus fréquents.
- Vérifier la croissance des cultures le cinquième jour et procéder à la collecte lorsque les cultures ont des colonies de taille suffisante. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les cultures sont alimentées avec CHANG Amnio la veille de la collecte.

CONSERVATION ET STABILITÉ

Le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'il est conservé congelé en dessous de -10 °C. 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. Il peut être congelé deux fois 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. Ne pas utiliser CHANG Amnio au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

PORTUGUÊS

INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO

O CHANG Amnio com gentamicina e L-glutamina pode ser utilizado nas seguintes aplicações:

1. cultura primária de células do líquido amniótico.
2. células do líquido amniótico obtidas por passagem em crescimento.
3. tecido sólido do âmnio obtido por colheita de amostras das vilosidades coriônicas.

Este meio foi concebido para utilização em incubadoras de CO₂ (culturas equilibradas com atmosfera de 5%–8% de CO₂).

O pH final tem de se situar entre 6,65 e 7,44. Consulte as Instruções de utilização.

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

O CHANG Amnio é um meio completo, pronto a utilizar, para a cultura primária de células do líquido amniótico (AFC) humano, de células de amostras de vilosidades coriônicas (CVS) e produtos de concepção (POC) para utilização na cariotipagem e noutros testes genéticos pré-natais. Foi otimizado para metodologias em frasco de cultura e *in situ*. Este produto contém o antibiótico sulfato de gentamicina (50 µg/ml).

COMPONENTES		
Tampões	Proteínas, hormonas e fatores de crescimento	Sulfato de magnésio
Bicarbonato de sódio	Soro bovino fetal (FBS)	Fosfato de sódio
Antioxidante	Soro bovino neonatal	Ácidos nucleicos
Ácido tióctico	Transferrina humana	Desoxiadenosina
Antibiótico	Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)	Desoxicitidina
Sulfato de gentamicina	Insulina	Desoxiguanosina
Aminoácido	Progesterona	Adenosina
Alanina	Testosterona	Citidina
Arginina	Beta-estradiol	Guanosina
Asparagina	Hidrocorisona	Timidina
Ácido aspártico		Uridina
Cisteína	Indicador de pH	
Ácido glutâmico	Vermelho de fenol	Quito
Glutamina		Álcool etílico
Glicina	Substratos energéticos	Tironina
Histidina	Glucose	Vitaminas e oligoelementos
Isoleucina	Piruvato	Ácido ascrbico
Leucina	Inositol	Ácido fólico
Lisina	Sais e iões	Nicotinamida
Metionina	Cloreto de sódio	Riboflavina
Fenilalanina	Selenito de sódio	Tiamina
Prolina	Cloreto de cálcio	Ácido pantoténico
Serina	Cloreto de colina	Cobalamina
Treonina	Cloreto de potássio	Piridoxina
Triptofano	Fosfato de potássio	Biotina
Tirosina		Água
Valina		Qualidade
		WFI (água p/ preparações injetáveis)

GARANTIA DE QUALIDADE

ESTERILIDADE

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

PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

Descongele sobre uma bancada estéril à temperatura ambiente ou colocando o frasco em banho-maria a uma temperatura de 37 °C.

O CHANG Amnio contém gentamicina (50 mg/l). Se pretender, pode adicionar mais antibióticos.

- DIVIDIR EM ALÍQUOTAS O CHANG Amnio
1. Descongele o CHANG Amnio de acordo com as instruções supramencionadas.
 2. Distribua asseticamente em alíquotas de tamanho conveniente e volte a congelar.
 3. Descongele as alíquotas em banho-maria a 37 °C quando estiver pronto para utilizar.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Utilização de CHANG Amnio para culturas primárias: metodologias *in situ*

1. Centrifugue o líquido amniótico a, aproximadamente, 1200 rpm durante 10 minutos para concentrar as células.
2. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando aproximadamente 0,5 ml acima do *pellet* de células (ou cerca de 2x volume do *pellet*) do líquido amniótico centrifugado. Divida o sobrenadante em alíquotas (pelo menos 1 ml, se possível) para ensaios de alfa-fetoproteína (AFP) e acetilcolinesterase, se necessário. Se a amostra estiver sanguinolenta, prepare uma alíquota adicional para mais testes. Ressuspenda o *pellet* de células num pequeno volume de líquido amniótico da própria doente. Adicione CHANG Amnio suficiente à suspensão de células concentrada para permitir o volume final em placa equivalente a 0,5 ml por lamela (total de 4 lamelas dependendo do tamanho do pellet de células) ou a 2 ml por frasco de cultura. Se o espécime for recebido de uma doente no terceiro trimestre da gravidez, o *pellet* pode ser maior mas conter menos células viáveis, sendo, por conseguinte, necessária o semear de forma mais intensiva (menos meio que o normal).
3. Incube as culturas sem interferência a 37 °C, numa atmosfera de 5%–8% de CO₂.
4. Inunde as culturas no 2.º dia, adicionando 2 ml de CHANG Amnio.
5. O crescimento das culturas deve ser verificado após 4 a 5 dias. Logo que se observe crescimento, as culturas devem ser alimentadas. Alimente as culturas, removendo todo o sobrenadante da cultura e substituindo-o por 2 ml de CHANG Amnio fresco. Recomenda-se que as culturas sejam alimentadas a cada 2 dias daí em diante. No caso de amostras sanguinolentas, pode ser necessário fazer trocas mais frequentes dos meios das culturas.
6. Verifique o crescimento das culturas no 5.º dia ou após esse dia e proceda à colheita quando se observarem colónias suficientes.
7. Os melhores resultados obtêm-se quando as culturas são alimentadas com CHANG Amnio no dia anterior à colheita.

Utilização do CHANG Amnio para culturas primárias: Metodologias em frasco de cultura

1. Centrifugue o líquido amniótico a, aproximadamente, 1200 rpm durante 10 minutos para concentrar as células.
2. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando aproximadamente 0,5 ml acima do *pellet* de células (ou cerca de 2x volume do *pellet*) do líquido amniótico centrifugado. Divida o sobrenadante em alíquotas (pelo menos 1 ml, se possível) para ensaios de alfa-fetoproteína (AFP) e acetilcolinesterase, se necessário. Se a amostra estiver sanguinolenta, prepare uma alíquota adicional para mais testes. Ressuspenda o *pellet* de células num pequeno volume de líquido amniótico da própria doente. Adicione 4 ml de CHANG Amnio para um volume total de 5 ml por frasco. Se o espécime for recebido de uma doente no terceiro trimestre da gravidez, o *pellet* pode ser maior mas conter menos células viáveis, sendo, por conseguinte, necessária o semear de forma mais intensiva (menos meio que o normal).
3. Incube as culturas sem interferência a 37 °C, numa atmosfera de 5%–8% de CO₂.
4. Verifique se existe crescimento no 5.º dia. Substitua o meio por 2 ml de CHANG Amnio fresco e efetue a colheita caso o crescimento celular seja suficiente.

5. Verifique o crescimento das culturas e substitua totalmente o meio todos os dias daí em diante até se observarem colónias suficientes prontas para colheita. No caso de amostras sanguinolentas, pode ser necessário fazer trocas mais frequentes dos meios das culturas.
6. Os melhores resultados obtêm-se quando as culturas são alimentadas com CHANG Amnio no dia anterior à colheita.

Utilização do CHANG Amnio para células do líquido amniótico obtidas por passagem em crescimento:

Para proceder à passagem das células, trate as culturas com tripsina (ou pronase, etc.) como faria normalmente quando as células crescem num meio convencional. Contudo, o tratamento com protease deve ser cuidadosamente monitorizado. As células do líquido amniótico que crescem em CHANG Amnio tendem a ser mais sensíveis ao tratamento com protease do que quando crescem num meio convencional. Pode ser necessário modificar o seu protocolo de modo a ter este facto em consideração.

Nota: O pH do meio utilizado para alimentação das culturas tem de se situar entre 6,65 e 7,44 (ou seja, o meio tem de ser de cor salmão ligeiramente amarelada). O ajuste do pH pode ser facilmente efetuado, colocando o meio numa incubadora com 5%–8% de CO₂ com a tampa ligeiramente desapertada durante cerca de 30 minutos.

Nota: o CHANG Amnio pode desenvolver alguns precipitados de oxalato de cálcio e de proteínas após a descongelação. Não se conhecem efeitos destes precipitados no desempenho do produto.

Preparação de amostra das vilosidades coriônicas:

1. Identifique uma placa de Petri para cada espécime recebido e transfira asseticamente o conteúdo da amostra. Adicione 5 ml do meio completo CHANG Amnio pré-aquecido à placa e coloque numa incubadora durante 30 minutos, a 35 °C–39 °C, numa atmosfera de 5%–8% CO₂, para permitir que o sangue assente.
2. Limpe o espécime com um microscópio de dissecação, inicialmente com uma ampliação de 1,5X e ajustando posteriormente para uma ampliação de aproximadamente 3X. Nota: É necessária uma amostra de vilosidades coriônicas de aprox. 20–40 mg.
3. Utilizando dois pares de pinças estéreis, retire os coágulos sanguíneos e qualquer decídua materna do material das vilosidades enquanto trabalha na placa sob visualização com o microscópio de dissecação. O material das vilosidades apresenta uma cor clara, um padrão tubular e/ou aglomerados com ramificações e veias visíveis.
4. Transfira as vilosidades limpas para outra placa de Petri contendo o meio completo CHANG Amnio pré-aquecido. Efetue a limpeza final, utilizando uma pinça para segurar as vilosidades e agitá-las suavemente. Nota: 5 mg é a quantidade ideal a utilizar por cultura. Tenha cuidado para evitar danificar as vilosidades frágeis.
5. Transfira as vilosidades e os meios para um tubo de centrifugadora de 15 ml, e adicione 4 gotas de antibiótico (ou seja, sulfato de gentamicina, 50 µl/ml) ao tubo de centrifugadora. Deixe repousar durante 30 minutos.
6. Centrifugue as vilosidades a, aproximadamente, 1400 rpm durante 5 minutos.

Cultura de amostra das vilosidades coriônicas:

1. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, assegurando-se de que deixa 0,5 ml de meio acima do *pellet* de células (ou cerca de 2X volume do *pellet*).
2. Ressuspenda suavemente o *pellet*. Adicione 2 ml de meio CHANG Amnio pré-aquecido ao tubo de centrifugadora.
3. Adicione 2 ml de EDTA com tripsina e incube a cultura sem interferência a 35 °C–39 °C, numa atmosfera de 5%–8% de CO₂ durante 10 minutos. Retire o tubo da incubadora, ressuspenda o *pellet* e coloque na incubadora durante mais 10 minutos.

4. Retire o tubo de centrifugadora da incubadora, ressuspenda o *pellet* e centrifugue durante 8 a 10 minutos a 1400 rpm.
5. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado. Ressuspenda o *pellet* e, em seguida, adicione 1 ml de collagenase ao tube e coloque na incubadora durante 5 minutos.
6. Retire da incubadora e examine visualmente para verificar se o *pellet* está turvo e se não se observam fragmentos separados de vilosidades. Se o *pellet* não estiver turvo, volte a colocá-lo na incubadora durante 5 minutos adicionais.
7. Adicione 3 ml de CHANG Amnio pré-aquecido ao tubo de centrifugadora para parar a ação da collagenase.
8. Centrifugue o tubo durante 8 a 10 minutos a 1400 rpm.
9. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando 0,5 ml de meio acima do *pellet* de células. Ressuspenda o *pellet* antes de adicionar o CHANG Amnio utilizado para preparação.
10. Coloque o número de culturas ideal utilizando 0,5 ml de CHANG Amnio por cultura para cada placa de Petri que contenha uma lamela.
11. Incube as culturas sem interferência a 35 °C–39 °C, numa atmosfera de 5%–8% de CO₂.
12. Inunde as culturas no 2.º dia, adicionando 1,5 ml de CHANG Amnio pré-aquecido.
13. O crescimento das culturas deve ser verificado aos 4 dias. Caso se observe crescimento, retire o meio e adicione 2 ml de CHANG Amnio pré-aquecido recém-preparado a cada lamela. As culturas devem ser alimentadas a cada 2 dias daí em diante. No caso de amostras sanguinolentas, pode ser necessário fazer trocas mais frequentes dos meios das culturas.
14. Verifique o crescimento das culturas no 5.º dia e proceda à colheita de colónias, quando estas forem suficientes. Os melhores resultados obtêm-se quando as culturas são alimentadas com CHANG Amnio no dia anterior à colheita.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

ConsERVE congelado a uma temperatura inferior a -10 °C. O produto é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo do frasco, desde que conservado congelado. O produto não usado pode ser dispensado 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; pode ser congelado 2 vezes no máximo. 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. Não utilize nenhum frasco cuja embalagem estéril tenha sido comprometida. Não utilize o CHANG Amnio para além do prazo de validade indicado no rótulo.

DANSK

INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

CHANG Amnio med gentamicin og L-glutamin kan anvendes til følgende applikationer:

- 1. Primær dyrkning af amnionvæskeceller
- 2. Dyrkning af passerede amnionvæskeceller
- 3. Solidt amnionvæv fra chorionvilli-prøver.

Dette medium er fremstillet til brug i CO₂-inkubatorer (kulturer der er tilpasset en atmosfære med 5-8 % CO₂).

Den endelige pH-værdi skal ligge på 6,65-7,44. Se brugsanvisningen.

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

CHANG Amnio er et komplet, brugsklart medium til primær dyrkning af humane amnionvæskeceller (AFC), chorionvilli-prøver (CVS) og forplantningsprodukter (POC) til karyotypebestemmelse og anden antenatal genetisk testning. Det er optimeret til metodologier til såvel kolbe som in situ. Dette medium indeholder antibiotikummet gentamicinsulfat (50 µg/ml).

KOMPONENTER

Buffere Natriumbikarbonat	Proteiner, hormoner og vækstfaktorer Føtal bovint serum (FBS) Serum fra nyfødt kalv	Nukleinsyrer Deoxyadenosin Deoxycytidin Deoxyguanosin
Antioxidant Thioctsyre	Human transferrin Fibroblastvækst-faktor (FGF)	Adenosin Cytidin Guanosin Thyridin Uridin
Antibiotikum Gentamicinsulfat	Insulin Progesteron Testosteron Beta-østradiol Hydrokortison	Andet Ætylalkohol Thyronin
Aminosyre Alanin Arginin Asparagin Asparaginsyre Cystein Glutaminsyre Glutamin Glycin Histidin Isoleucin Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tryptofan Tyrosin Valin	pH-indikator Rød fenol Energisubstrater Glukose Pyruvat Inositol	Vitaminer og sporelementer Ascorbinsyre Folinsyre Nicotinamid Riboflavin Thiamin Pantothensyre Cobalamin Pyridoxin Biotin
	Salte og ioner Kaliumklorid Natriumselenit Kaliumklorid Koliklorid Kaliumklorid Kaliumfosfat Magnesiumsulfat Natriumfosfat	Vand Af kvalitet til injektionsvæske

KVALITETSSIKRING

STERILITET

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

KLARGØRING

Optas på en steril bordoverflade ved stuetemperatur eller ved at placere flasken i et 37 °C vandbad.

CHANG Amnio indeholder gentamicin (50 mg/l). Der kan eventuelt tilsættes ekstra antibiotika.

AFMÅLING AF CHANG Amnio

- 1. Opte CHANG Amnio ifølge ovenstående instruktioner.
- 2. Fordel mediet aseptisk i mængder af passende størrelse, og nedfrys dem igen.
- 3. Opte de opdelte mængder i et 37 °C vandbad, når de skal bruges.

BRUGSANVISNING

Anvendelse af CHANG Amnio til primære kulturer: metodologier *in situ*

- 1. Centrifuger amnionvæsken ved ca. 1.200 o/min. i 10 minutter for at koncentrere cellerne.
- 2. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør, og efterlad ca. 0,5 ml over cellepelleten (eller ca. 2x pelletvolumen) af den centrifugerede amnionvæske. Afmål supernatanten (mindst 1 ml, hvis det er muligt) for alfafetoprotein (AFP) og om nødvendigt acetylkolinesteraseanalyser. Forbered en ekstra afmåling til yderligere testning, hvis prøven er blodig. Resuspender cellepelleten i en lille volumen af patientens egen amnionvæske. Tilsæt nok CHANG Amnio til den koncentrede cellesuspension til at få en endelig udsåningsvolumen på 0,5 ml pr. dækglas (i alt 4 dækglas, afhængigt af størrelsen på cellepelleten) eller 2 ml pr. ampul. Hvis prøven kommer fra en patient i tredje graviditetstrimester, kan pelleten være større, men indeholde færre levedygtige celler og således kræve større tilsåning (mindre medium end normalt).
- 3. Inkuber kulturerne uforstyrret ved 37 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂.
- 4. Skyl kulturerne på dag 2 ved at tilsætte 2 ml CHANG Amnio.
- 5. Efter 4-5 dage skal kulturernes vækst kontrolleres. Kulturerne skal næres, når der er observeret vækst. Dette gøres ved at fjerne hele kultursupernatanten og erstatte den med 2 ml friskt CHANG Amnio. Det anbefales, at kulturerne næres hver anden dag herefter. I forbindelse med blodige prøver kan kulturerne kræve hyppigere medieskift.
- 6. Kontroller kulturernes vækst på eller efter dag 5, og høst, når der observeres nok kolonier.
- 7. De bedste resultater opnås, hvis kulturerne forsynes med CHANG Amnio dagen inden høsten.

Anvendelse af CHANG Amnio til primære kulturer: Metodologi med kolbe

- 1. Centrifuger amnionvæsken ved ca. 1.200 o/min. i 10 minutter for at koncentrere cellerne.
- 2. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør, og efterlad ca. 0,5 ml over cellepelleten (eller ca. 2x pelletvolumen) af den centrifugerede amnionvæske. Afmål supernatanten (mindst 1 ml, hvis det er muligt) for alfafetoprotein (AFP) og om nødvendigt acetylkolinesteraseanalyser. Forbered en ekstra afmåling til yderligere testning, hvis prøven er blodig. Resuspender cellepelleten i en lille volumen af patientens egen amnionvæske. Tilsæt 4 ml CHANG Amnio, så den totale volumen er 5 ml pr. kolbe. Hvis prøven kommer fra en patient i tredje graviditetstrimester, kan pelleten være større, men indeholde færre levedygtige celler og således kræve større tilsåning (mindre medium end normalt).
- 3. Inkuber kulturerne uforstyrret ved 37 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂.
- 4. Kontroller væksten på dag 5. Udskift mediet med 2 ml friskt CHANG Amnio og høst, hvis der observeres tilstrækkelig cellevækst.
- 5. Kontroller kulturernes vækst, og udskift mediet fuldstændigt hver dag herefter, indtil der observeres nok kolonier, som er klar til at blive høstet. I forbindelse med blodige prøver kan kulturerne kræve hyppigere medieskift.
- 6. De bedste resultater opnås, hvis kulturerne forsynes med CHANG Amnio dagen inden høsten.

Anvendelse af CHANG Amnio til dyrkning af passerede amnionvæskeceller:

Passage af cellerne opnås ved at behandle kulturerne med trypsin (eller pronase m.m.) som ved celler, der dyrkes i konventionelt medium. Proteasebehandling skal imidlertid overvåges nøje. Amnionvæskeceller, der dyrkes i CHANG Amnio, har en tendens til at være mere sensitive over for proteasebehandling end dem, der dyrkes i konventionelt medium. Det kan være nødvendigt at ændre protokollen for at tage hensyn hertil.

Bemærk: pH-værdien af det medium, der anvendes til kulturerne, skal være 6,65-7,44 (dvs. at mediet skal have en let gullig laksefarve). pH-værdien kan let justeres ved at anbringe mediet i en inkubator med 5-8 % CO₂ med låget løstet let i ca. 30 minutter.

Bemærk: Chang Amnio kan udvikle calciumoxalat og proteinudfældninger ved optøning. Disse udfældninger har ikke nogen kendt indvirkning på produktets ydeevne.

Forberedelse af chorionvilli-prøver:

- 1. Sæt en etiket på en petriskål til hver modtaget prøve, og overfør indholdet af prøven aseptisk. Tilsæt 5 ml af det forvarmede CHANG Amnio komplet medium til skålen, og anbring den i en inkubator i 30 minutter ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂ for at lade blodet bundfælde sig.
- 2. Rens prøven under et dissektionsmikroskop, indledningsvis under 1,5x forstørrelse og med efterfølgende justering til ca. 3x forstørrelse. Bemærk: Det er nødvendigt med 20-40 mg chorionvilli-prøve.
- 3. Arbejd i skålen under dissektionsmikroskopet, og anvend to sterile pincetter til at fjerne blodkoagler og evt. maternel decidua fra villus-materialet. Villus-materialet har en lys farve og er tubulært og/eller bulet med synlige forgreninger og vener.
- 4. Overfør de rensede villi til en anden petriskål, der indeholder forvarmet CHANG Amnio komplet medium. Udfør en sidste rengøring med pincetter for at tage fat i villi, og ryst forsigtigt. Bemærk: 5 mg er en ideel mængde at bruge pr. kultur. Pas på ikke at beskadige de skrøbelige villi.
- 5. Overfør villi og medium til et 15 ml centrifugerør, og tilsæt 4 dråber antibiotikum (dvs. gentamicinsulfat, 50 µl/ml) til centrifugerøret. Lad det hvile i 30 minutter.
- 6. Centrifuger villi ved ca. 1.400 o/min. i 5 minutter.

Chorionvilli-prøvekultur:

- 1. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør, og sørg for at efterlade 0,5 ml medium over cellepelleten (eller ca. 2x pelletvolumen).
- 2. Resuspender pelleten forsigtigt. Tilsæt 2 ml forvarmet CHANG Amnio-medium til centrifugerøret.
- 3. Tilsæt 2 ml trypsin-EDTA, og inkuber kulturen uforstyrret ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂ i 10 minutter. Tag røret ud af inkubatoren, resuspender pelleten, og anbring den i inkubator i yderligere 10 minutter.
- 4. Tag centrifugerøret ud af inkubatoren, resuspender pelleten, og centrifuger i 8-10 minutter ved 1.400 o/min.
- 5. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør. Resuspender pelleten, tilsæt derefter 1 ml kollagenase til røret, og anbring det i inkubator i 5 minutter.
- 6. Tag røret ud af inkubatoren, og se efter, om pelleten er uklar, og at der ikke kan ses enkelte stykker villi. Hvis pelleten ikke er uklar, sættes den tilbage i inkubatoren i 5 minutter mere.
- 7. Tilsæt 3 ml forvarmet CHANG Amnio til centrifugerøret for at stoppe aktivitet af kollagenase.
- 8. Centrifuger røret i 8-10 minutter ved 1.400 o/min.
- 9. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør, og efterlad 0,5 ml medium over cellepelleten. Resuspender pelleten før tilsætning af CHANG Amnio, der skal bruges til opsætning.
- 10. Sæt det optimale antal kulturer op med 0,5 ml CHANG Amnio pr. kultur i hver petriskål, der indeholder et dækglas.
- 11. Inkuber kulturerne uforstyrret ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂.
- 12. Skyl kulturerne på dag 2 ved at tilsætte 1,5 ml forvarmet CHANG Amnio.
- 13. Efter 4 dage skal kulturernes vækst kontrolleres. Hvis der observeres vækst, fjernes mediet, og der tilsættes 2 ml frisk forvarmet CHANG Amnio til hvert dækglas. Kulturerne skal næres hver anden dag herefter. I forbindelse med blodige prøver kan kulturerne kræve hyppigere medieskift.
- 14. Kontroller kulturernes vækst på dag 5, og høst, når der observeres nok kolonier. De bedste resultater opnås, hvis kulturerne forsynes med CHANG Amnio dagen inden høsten.

OPBEVARING OG STABILITET

Opbevares frossent under -10 °C. Produktet er stabilt indtil udløbsdatoen på flaskeetiketten ved opbevaring i frossen tilstand. Ubrugt produkt kan afmåles i brugelige mængder og genfryses til senere anvendelse eller lukkes tæt til og opbevares ved 2-8 °C i op til 30 dage. Det kan maksimalt nedfryses to gange. 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.

Flasker, hvis sterile emballage er blevet kompromitteret, må ikke anvendes.

Anvend ikke CHANG Amnio efter den udløbsdato, der er angivet på etiketten.

NEDERLANDS

INDICATIE VOOR GEBRUIK

CHANG Amnio met gentamicine en L-glutamine kan worden gebruikt voor de volgende toepassingen:

1. de primaire kweek van vruchtwatercellen
2. het groeien van gepasseerde vruchtwatercellen
3. vast amnionweefsel van een chorionvillusbiospie.

Dit medium is bedoeld voor gebruik in CO₂-incubators (kweken geëquillibreerd met 5%-8% CO₂-atmosfeer).

De uiteindelijke pH moet tussen de 6,65 en 7,44 liggen; zie Gebruiksaanwijzing.

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

CHANG Amnio is een compleet, gebruiksklaar medium voor de primaire kweek van menselijke vruchtwatercellen (AFC), chorionvillusbiospie (CVS) en conceptieproducten (POC) voor gebruik bij karyotypering en ander prenataal genetisch onderzoek. Deze formule is geoptimaliseerd voor zowel fles- als in situ methodes. Dit product bevat het antibioticum gentamicinesulfaat (50 µg/ml).

COMPONENTEN		
Buffers	<u>Eiwitten, hormonen en groeifactoren</u>	<u>Nucleïnezuren</u>
Natriumbicarbonaat	Foetaal runderserum (FBS)	Deoxyadenosine
Antioxidant	Pasgeboren kalfsserum	Deoxycytidine
Alfa-liponzuur	Menselijk transferine	Deoxyguanosine
Antibioticum	Fibroblast groeifactor (FGF)	Adenosine
Gentamicinesulfaat	Insuline	Cytidine
	Progesteron	Guanosine
	Tëstosteron	Thymidine
	Bëta-oestradiol	Uridine
	Hydrocortison	
<u>Aminozuren</u>	<u>Overige</u>	
Alanine	Ethylalcohol	
Arginine	Thyronine	
Asparagine		
Asparaginezuur	<u>Vitaminen en sporelementen</u>	
Cysteine	Ascorbinezuur	
Glutaminezuur	Foliumzuur	
Glutamine	Nicotinamide	
Glycine	Riboflavine	
Histidine	Thiamine	
Isoleucine	<u>Energie substraten</u>	
Leucine	Glucose	
Lysine	Pruvaat	
Methionine	Inositol	
Fenylalanine	<u>Zouten en ionen</u>	
Proline	Natriumchloride	
Serine	Natriumseleniet	
Treonine	Calciumchloride	<u>Water</u>
Tryptofaan	Cholinechloride	Farmaceutisch kwaliteitswater (WFI)
Tyrosine	Kaliumchloride	
Valine	Kaliumfosfaat	
	Magnesiumsulfaat	
	Natriumfosfaat	

KWALITEITSBORING

STERILITEIT

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

VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

Ontdooi op een steriel werkblad bij kamertemperatuur of door de fles in een waterbad van 37 °C te plaatsen.

CHANG Amnio bevat gentamicinesulfaat (50 mg/l). Aanvullende antibiotica kunnen desgewenst worden toegevoegd.

OPDELEN VAN CHANG Amnio

1. Ondooi CHANG Amnio volgens de bovenstaande instructies.
2. Verdeel op aseptische wijze in praktische hoeveelheden en vries deze opnieuw in.
3. Ondooi de delen net voor gebruik in een waterbad van 37 °C.

GEBRUIKSAANWIJZING

Gebruik van CHANG Amnio voor primaire kweken: *in situ*-methode.

1. Centrifugeer het vruchtwater 10 minuten op ca. 1200 omw/min om de cellen te concentreren.
2. Aspireer het supernatant uit het gecentrifugeerde buisje en laat ongeveer 0,5 ml van het gecentrifugeerde vruchtwater (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) boven de celpellet staan. Verdeel het supernatant in gelijke delen (indien mogelijk minstens 1 ml) voor bepaling van alfafoetoproteïne (AFP) en acetylcholinesterase, indien nodig. Prepareer, als er bloed in het monster wordt waargenomen, een extra hoeveelheid voor aanvullende tests. Resuspender de celpellet in een kleine hoeveelheid eigen vruchtwater van de patiënt. Voeg voldoende CHANG Amnio aan de geconcentreerde celsuspensie toe tot een eindvolume van 0,5 ml per dekglasje (4 dekglasjes in totaal, afhankelijk van de grootte van de celpellet) of 2 ml per flesje is verkregen. Als het monster van een patiënt in het derde trimester van de zwangerschap is verkregen, kan de pellet groter zijn, maar minder levensvatbare cellen bevatten, waardoor er meer zaadcellen nodig zijn (minder medium dan normaal).
3. Zet de kweken ongestoord in de incubator bij 37 °C en 5-8% CO₂-atmosfeer.
4. Bedek de kweken op dag 2 volledig door 2 ml CHANG Amnio toe te voegen.
5. Controleer na 4 à 5 dagen of de kweken zijn gegroeid. Nadat is vastgesteld dat de kweken groeien, moeten ze worden gevoed. Voed de kweken door al het kweeksupernatant te verwijderen en te vervangen door 2 ml vers CHANG Amnio. Aanbevolen wordt de kweken daarna elke twee dagen te voeden. Als het monster bloed bevat, kan het nodig zijn het medium vaker te vervangen.
6. Controleer de kweken op of na dag 5 op groei en oogst als er voldoende koloniën worden waargenomen.
7. De beste resultaten worden verkregen als de kweken op de dag vóór het oogsten met CHANG Amnio worden gevoed.

Gebruik van CHANG Amnio voor primaire kweken: flesmethode

1. Centrifugeer het vruchtwater 10 minuten op ca. 1200 omw/min om de cellen te concentreren.
2. Aspireer het supernatant uit het gecentrifugeerde buisje en laat ongeveer 0,5 ml van het gecentrifugeerde vruchtwater (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) boven de celpellet staan. Verdeel het supernatant in gelijke delen (indien mogelijk minstens 1 ml) voor bepaling van alfafoetoproteïne (AFP) en acetylcholinesterase, indien nodig. Prepareer, als er bloed in het monster wordt waargenomen, een extra hoeveelheid voor aanvullende tests. Resuspender de celpellet in een kleine hoeveelheid eigen vruchtwater van de patiënt. Voeg 4 ml CHANG Amnio toe tot een totaal volume van 5 ml per fles. Als het monster van een patiënt in het derde trimester van de zwangerschap is verkregen, kan de pellet groter zijn, maar minder levensvatbare cellen bevatten, waardoor er meer zaadcellen nodig zijn (minder medium dan normaal).
3. Zet de kweken ongestoord in de incubator bij 37 °C en 5%-8% CO₂-atmosfeer.
4. Controleer de groei op dag 5. Vervang het medium door 2 ml vers CHANG Amnio en oogst als er voldoende celgroei wordt waargenomen.
5. Controleer daarna elke dag of de kweken gegroeid zijn en vervang het medium volledig tot er voldoende koloniën worden waargenomen die kunnen worden geoogst. Als het monster bloed bevat, kan het nodig zijn het medium vaker te vervangen.
6. De beste resultaten worden verkregen als de kweken op de dag vóór het oogsten met CHANG Amnio worden gevoed.

Gebruik van CHANG Amnio voor het groeien van gepasseerde vruchtwatercellen:

Passeer de cellen door de kweken met trypsine (of pronase etc.), te behandelen, zoals u dat normaal gesproken zou doen bij cellen die in een traditioneel medium gekweekt zijn. Proteasebehandeling dient echter zorgvuldig in de gaten te worden gehouden. Vruchtwatercellen die in CHANG Amnio zijn gekweekt, zijn vaak gevoeliger voor proteasebehandeling dan vruchtwatercellen die in een traditioneel medium zijn gekweekt. Houd hier rekening mee en wijzig zo nodig uw protocol.

NB: De pH van het medium dat wordt gebruikt om de kweken te voeden, moet tussen 6,65 en 7,44 liggen (d.w.z. dat het medium een enigszins gelige zalmkleur moet hebben). De pH-waarde kan eenvoudig worden aangepast door het medium met een iets losgedraaide dop gedurende circa 30 minuten in een 5-8% CO₂-incubator te zetten.

NB: Bij het ontdooien zal Chang Amnio mogelijk wat calciumoxalaat- en eiwitneerslag vormen. Deze neerslag heeft voor zover bekend geen invloed op de prestaties van het product.

Monsterpreparatie van chorionvilli:

1. Label een petrischaal voor elk ontvangen monster en breng de inhoud van een monster op aseptische wijze over. Voeg 5 ml van het voorverwarmde, complete CHANG Amnio-medium toe aan de schaal en plaats deze 30 minuten in een incubator bij 35-39 °C en 5-8% CO₂-atmosfeer, zodat het bloed kan bezinken.
2. Reinig het monster met behulp van een dissectiemicroscoop, eerst onder een 1,5X vergroting, en pas deze daarna aan tot een vergroting van circa 3X. NB: Er is een chorionvillmonster van circa 20-40 mg vereist.
3. Verwijder onder de dissectiemicroscoop bloedklonters en eventuele maternale decidua met behulp van twee steriele forceps van het villusmateriaal, waarbij u in de schaal werkt. Villusmateriaal is licht van kleur, tubulair en/of klonterig met zichtbare affakkingen en aderen.
4. Breng schoongemaakte villi over naar een andere petrischaal dat voorverwarmd, compleet CHANG Amnio-medium bevat. Voer een laatste reiniging uit door de villi met forceps op te pakken en ze zachtjes heen en weer te bewegen NB: 5 mg per kweek is ideaal. Wees voorzichtig dat u de kwetsbare villi niet beschadigt.
5. Breng de villi en het medium over naar een centrifugeerbuisje van 15 ml en voeg 4 druppels antibioticum (d.w.z. gentamicinesulfaat, 50 µg/ml) aan het centrifugeerbuisje toe. Laat 30 minuten staan.
6. Centrifugeer de villi gedurende 5 minuten op een snelheid van ca. 1400 omw/min.

Monsterkweek van chorionvilli:

1. Aspireer het supernatant uit het gecentrifugeerde buisje en laat 0,5 ml medium boven de celpellet (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) staan.
2. Resuspender de pellet voorzichtig. Voeg 2 ml voorverwarmd CHANG Amnio-medium aan het centrifugeerbuisje toe.
3. Voeg 2 ml trypsine EDTA toe en incubeer de kweek gedurende 10 minuten ongestoord bij 35-39 °C en 5-8% CO₂-atmosfeer. Haal het buisje uit de incubator, resuspender de pellet en zet opnieuw 10 minuten in de incubator.
4. Haal het centrifugeerbuisje uit de incubator, resuspender de pellet en centrifugeer 8-10 minuten op 1400 omw/min.
5. Aspireer het supernatant uit het gecentrifugeerde buisje. Resuspender de pellet, voeg vervolgens 1 ml collagenase aan het buisje toe en zet gedurende 5 minuten in de incubator.
6. Haal het buisje uit de incubator en controleer visueel of de pellet troebel is en er geen afzonderlijke stukjes villi zichtbaar zijn. Als de pellet niet troebel is, zet u deze nog eens 5 minuten terug in de incubator.
7. Voeg 3 ml voorverwarmd CHANG Amnio aan het centrifugeerbuisje toe om de werking van de collagenase te stoppen.

8. Centrifugeer het buisje 8-10 minuten op 1400 omw/min.
9. Aspireer het supernatant uit het gecentrifugeerde buisje en laat 0,5 ml medium boven de celpellet staan. Resuspender de pellet voordat u CHANG Amnio toevoegt voor preparatie.
10. Prepareer het optimale aantal kweken met behulp van 0,5 ml CHANG Amnio per kweek voor elke petrischaal met een dekglasje.
11. Zet de kweken ongestoord in de incubator bij 35-39 °C en 5-8% CO₂-atmosfeer.
12. Bedek de kweken op dag 2 volledig door 1,5 ml voorverwarmd CHANG Amnio toe te voegen.
13. Controleer na 4 dagen of de kweken zijn gegroeid. Als er groei wordt waargenomen, verwijdert u het medium en voegt u aan elk dekglasje 2 ml vers voorverwarmd CHANG Amnio toe. Voed de kweken daarna elke 2 dagen. Als het monster bloed bevat, kan het nodig zijn het medium vaker te vervangen.
14. Controleer de kweken op dag 5 op groei en oogst als er voldoende koloniën worden waargenomen. De beste resultaten worden verkregen als de kweken op de dag vóór het oogsten met CHANG Amnio worden gevoed.

BEWAREN EN STABILITEIT

Bewaar ingevroren bij een temperatuur lager dan -10 °C. Het product is stabiel tot de houdbaarheidsdatum op het etiket van de fles, mits het ingevroren wordt bewaard. Ongebruikt product kan worden opgedeeld 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. Het product mag maximaal twee keer opnieuw worden ingevroren. 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. Gebruik geen flessen waarvan de steriele verpakking beschadigd is. Gebruik CHANG Amnio niet na de houdbaarheidsdatum op het etiket.

POLSKI	ROZSKŁAD POŻYWKI CHANG Amnio NA PORCJE
PRZEZNACZENIE	1. Rozmrozić pożywkę CHANG Amnio zgodnie z powyższymi instrukcjami.
Pożywką CHANG Amnio z gentamycyną i L-glutaminą może być stosowana w przypadku:	2. W sposób aseptyczny rozdzielić pożywkę na porcje o odpowiednim rozmiarze, a następnie zamrozić ponownie.
1. hodowli pierwotnej komórek płynu owodniowego,	3. Gdy porcje będą gotowe do użycia, rozmrozić je w łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 37°C.
2. wzrostu pasażowanych komórek płynu owodniowego,	
3. lilej tkanki owodniowej z biopsji kosmków kosmków.	

Tę pożywkę zaprojektowano do użytku w inkubatorach z atmosferą CO₂ (hodowle doprowadzone do równowagi w atmosferze 5%–8% CO₂).

Końcowa wartość pH musi wynosić 6,65–7,44 Patrz część „Instrukcja użycia”.

OPIS WYROBU

Produkt CHANG Amnio to kompletna pożywka gotowa do użycia do hodowli pierwotnej ludzkich komórek płynu owodniowego (AFC), kosmków kosmkówi z biopsji (CVS) o produktów zapłodnienia (POC) przeznaczonych do kariotypowania i wykonywania innych prenatalnych testów genetycznych. Pożywkę tę zoptymalizowano dla metod hodowli w butelkach oraz metod in situ. Produkt zawiera antybiotyk w postaci siarczanu gentamycyny (50 µg/ml).

	SKŁADNIKI	
Bufory	Białka, hormony i czynniki wzrostu	Siarczan magnezu
Wodorowęglan sodu	Plodowa surowica bydlęca (FBS)	Fosforan sodu
Antyoksydant	Surowica nowonarodzonych cieląt	Kwasy nukleinowe
Kwas tioktatanowy	Ludzka transferyna	Deoksyadenozyna
Antybiotyk	Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF)	Deokscytidylna
Siarczan gentamycyny	Insulina	Deoksyguanozyna
	Progesteron	Uridyna
	Testosteron	
	Beta-estradiol	Inne
	Hydrokortyzon	Alkohol etylowy
		Tyrylina
Aminokwasy	Wskaźnik pH	Witaminy i pierwiastki śladowe
Kwas tioktatanowy	Kwas fenolowa	Kwas askorbinowy
Glutamina		Kwas foliowy
Glicyna	Substraty energetyczne	Nikotynamid
Histydyna	Glukozaz	Pirogronian
Izoleucyna		Inozytol
Leucyna		Tiamina
Lizyna	Sole i jony	Kwas pantotenowy
Metionina	Chlorek sodu	Kobalamina
Fenylalanina	Selenian sodu	Pirydoksyna
Prolina	Chlorek wapnia	Biotylna
Seryna	Chlorek choliny	
Treonina	Chlorek potasu	Woda
Tryptofan		Woda o jakości WFI
Tyrozyna		
Walina		

ZAPEWNIANIE JAKOŚCI STERYLNOŚĆ

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

PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA

Rozmrozić pożywkę na sterylnym błacie w temperaturze pokojowej lub umieszczając butelkę pożywki w łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 37°C.

Pożywką CHANG Amnio zawiera gentamycynę (50 mg/l). W razie potrzeby można dodać dodatkowe antybiotyki.

- Wykonać przy tej czynności codziennie sprawdzać wzrost hodowli i całkowicie wymieniać pożywkę do czasu zaobserwowania wystarczającej liczby kolonii gotowych do zbioru. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożywki.
- Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowle pożywką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

Stosowanie pożywki CHANG Amnio do wzrostu pasażowanych komórek płynu owodniowego:

Aby wykonać pasaż komórek, poddać hodowle działaniu trypsyny (lub pronazy itp.), w taki sam sposób, jak w przypadku komórek rosnących w pożywce standardowej. Jednakże należy ściśle monitorować komórki poddawane działaniu proteazy. Komórki płynu owodniowego rosnące w pożywce CHANG Amnio zwykle są bardziej wrażliwe na działanie proteazy niż gdy rosną w pożywce standardowej. W celu uwzględnienia tego faktu może być konieczne wprowadzenie zmian w protokole.
Uwaga: Wartość pH pożywki używanej do zasilania hodowli musi mieścić się w zakresie 6,65–7,44 (tzn. kolor pożywki musi być lekko żółtawo-lososiowy). Wartość pH można łatwo wyregulować, umieszczając pożywkę w butelce z lekko odkręconą zakrętką w inkubatorze z atmosferą 5–8% CO₂ na około 30 minut.

Uwaga: Przy rozmarzaniu pożywki Chang Amnio mogą wytrącać się pewne ilości szczawianu wapnia i białek w postaci osadów. Nie stwierdzono, aby te osady wpływały na właściwości produktu.

Przygotowanie próbki kosmków kosmkówi:

- Oznaczyć szalkę Petriego danymi identyfikacyjnymi otrzymaną próbkę i w sposób aseptyczny przenieść całą próbkę na szalkę. Dodać 5 ml wstępnie ogrzanej, kompletnej pożywki CHANG Amnio na szalkę i umieścić ją w inkubatorze z atmosferą 5–8% CO₂ nastawionym na temperaturę 35–39°C na 30 minut, aby krew osiadła na dnie.
- Oczyszczyć próbkę, korzystając z mikroskopu stereoskopowego. Rozpocząć pracę przy powiększeniu 1,5X, a następnie zwiększyć powiększenie do 3X. Uwaga: Próbką kosmków kosmkówi powinna ważyć około 20–40 mg.
- Używając dwóch sterylnych szczypic, usunąć z materiału kosmków kosmkówi skrzepy krwi i doczesną matki. Pracować na szalce, pod mikroskopem stereoskopowym. Materiał kosmków ma jasny kolor, strukturę kanalikową i/lub guzkowatą z widocznymi gałęziami i żyłami.
- Przenieść oczyszczone kosmki na nową szalkę Petriego zawierającą wstępnie ogrzaną, kompletną pożywkę CHANG Amnio. Wykonać końcowe oczyszczanie, używając szczypic do chwytnia kosmków i delikatnie wytrząsając je. Uwaga: Idealna ilość próbki na hodowlę to około 5 mg. Uważać, aby nie uszkodzić delikatnych kosmków.

5. Przenieść kosmki i pożywkę do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml i dodać 4 krople antybiotyku (tj. siarczanu gentamycyny, 50 µg/ml) do probówki wirówkowej. Pozostawić na 30 minut.

6. Wirować kosmki przy ok. 1400 rpm przez 5 minut.

Przygotowanie hodowli z próbki kosmków kosmkówi:

- Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając 0,5 ml pożywki nad osadem komórkowym (lub objętość równą około 2-krotnej objętości osadu).
- Delikatnie zawiesić osad. Dodać 2 ml wstępnie ogrzanej pożywki CHANG Amnio do probówki wirówkowej.
- Dodać 2 ml trypsyny z EDTA i inkubować hodowlę w temperaturze 35–39°C, w atmosferze 5–8% CO₂ przez 10 minut, nie zakłócając jej. Wyciągnąć próbówkę z inkubatora, ponownie zawiesić osad i umieścić w inkubatorze na dodatkowe 10 minut.
- Wyciągnąć próbówkę z inkubatora, zawiesić osad i wirować przez 8–10 minut przy 1400 rpm.
- Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki. Zawiesić osad, a następnie dodać 1 ml kolagenazy do probówki i umieścić w inkubatorze na 5 minut.

ROMÂNĂ

INDICAȚIE DE UTILIZARE

CHANG Amnio cu gentamicină și L-glutamină se poate utiliza pentru următoarele întrebuintări:

- cultura primară a celulelor din lichidul amniotic
- creșterea celulelor din lichidul amniotic pasajate
- țesut amniotic solid din probele de vilozități coriale colectate.

Acest mediu a fost proiectat pentru utilizare în incubatoare cu CO₂ (culturi echilibrate cu o atmosferă cu 5 - 8 % CO₂).

pH-ul final trebuie să fie de 6,65 - 7,44. Vă rugăm să consultați Instrucțiunile de utilizare.

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

CHANG Amnio este un mediu complet și gata de utilizare pentru cultura primară a celulelor din lichidul amniotic uman (AFC), recoltare de vilozități coriale (CVS) și produși de concepție (POC) în vederea utilizării pentru cariotipare și alte teste genetice prenatale. Formula a fost optimizată pentru metodologi atât cu flacon, cât și in situ. Acest produs conține antibioticul sulfat de gentamicină (50 µg/ml).

	COMPONENTE	
Soluții tampon	Proteine, hormoni și factori de creștere	Acizi nucleici
Bicarbonat de sodiu	Deoxiadenozină	Deoxicitidină
Antioxidant	(SFB)	Deoxiguanozină
Acid tiotic	Ser neonatal bovin	Citidină
	Transferină umană	Guanozină
Antibiotic	Factor de creștere a fibroblaștilor (FCF)	Timidină
Sulfat de gentamicină	Insulină	Uridină
	Aminoacizi	Altol
	Alanină	Alcool etilic
	Arginină	Tirozină
	Asparagină	
	Acid aspartic	Vitamine și oligoelemente
	Cisteină	Acid ascorbic
	Acid glutamic	Acid folic
	Glutamină	Nicotinamină
	Glicină	Riboflavină
	Histidină	Glucoză
	Izoleucină	Tiamină
	Leucină	Acid pantotenic
	Lizină	Cobalamină
	Metionină	Pridoxină
	Fenilalanină	Biotină
	Prolină	
	Serină	Apă
	Treonină	Calitate WFI
	Triptofan	(water for injection)
	Clorură de potasiu	[apă sterilă pentru injecții]
	Fosfat de potasiu	
	Sulfat de magneziu	
	Fosfat de sodiu	

ASIGURAREA CALITĂȚII

STERILITATE

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

PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

Dezghetați pe o masă sterilă la temperatura camerei sau plasând flaconul într-o baie de apă la 37 °C.

CHANG Amnio conține gentamicină (50 mg/l). Dacă se dorește, se pot adăuga antibiotice suplimentare.

REPARTIZAREA CHANG Amnio ÎN PĂRȚI ALICOTE

- Dezghetați CHANG Amnio în conformitate cu instrucțiunile de mai sus.
- Distribuiți aseptic în părți alicote de mărime convenabilă și recongelați.
- Dezghetați părțile alicote într-o baie de apă la 37 °C atunci când sunt gata pentru utilizare.

Utilizarea CHANG Amnio pentru creșterea celulelor din lichidul amniotic pasajate:

Pentru a pasaja celulele, tratați culturile cu tripsină (sau pronază etc.), așa cum ați proceda în mod normal atunci când celulele sunt crescute într-un mediu convențional. Cu toate acestea, tratamentul cu protează ar trebui monitorizat cu atenție. Celulele din lichidul amniotic crescute în CHANG Amnio tind să fie mai sensibile la tratamentul cu protează decât celulele crescute într-un mediu convențional. Poate fi necesar să vă modificați protocolul pentru a lua în considerare acest lucru.
Notă: pH-ul mediului utilizat pentru a hrăni culturile trebuie să fie cuprins între 6,65 - 7,44 (adică mediul trebuie să aibă o culoare ușor galbeu-somon). pH-ul poate fi ajustat cu ușurință punând mediul într-un incubator de 5 - 8 % CO₂ cu capacul ușor slăbit timp de 30 de minute.

Notă: Chang Amnio poate forma unele precipitate de oxalat de calciu și proteine la decongelare. Nu se cunoaște nimeni efect al acestor precipitate asupra performanței produsului.

Pregătirea cu probe de vilozități coriale:

- Etichetați un vas Petri pentru fiecare eprubetă primită și transferați conținutul probei în mod aseptc. Adăugați în vas 5 ml din mediul complet CHANG Amnio preîncălzit și puneți-l în incubator timp de 30 de minute la 35 - 39 °C, în atmosferă de 5 - 8 % CO₂, pentru a-i permite sângelui să se depună.
- Curățați proba folosind un microscop de disecție, mai întâi sub mărire 1,5X, apoi ajustând la o mărire de aproximativ 3X. Notă: Este necesară o probă de vilozități coriale de aprox. 20 - 40 mg.
- Folosind două perechi de forcepsuri sterile, îndepărtați cheagurile de sânge și orice decidaia maternă din materia cu vilozități, în timp ce lucrați în vas, sub microscop de disecție. Materia cu vilozități este deschisă la culoare, tubulară și/sau cu cocoloașe cu ramuri și vene vizibile.
- Transferați vilozitățile curate într-un alt vas Petri care conține mediul complet CHANG Amnio preîncălzit. Faceți curățarea finală, folosind forcepsuri pentru a apuca vilozitățile și agitați ușor. Notă: Cantitatea ideală de folosit pe cultură este de 5 mg. Aveți grijă să evitați vătămarea vilozităților fragile.
- Transferați vilozitățile și mediul într-o eprubetă pentru centrifugă de 15 ml și adăugați 4 picături de antibiotic (de ex. sulfat de gentamicină, 50 µl/ml) în eprubeta pentru centrifugă. Lăsați să stea 30 de minute.
- Centrifugați vilozitățile la aproximativ 1.400 rpm timp de 5 minute.

Utilizarea CHANG Amnio pentru culturi primare:
Metodologii cu flacon

- Centrifugați lichidul amniotic la aproximativ 1.200 rpm timp de 10 minute pentru a concentra celulele.
- Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă, lăsând aproximativ 0,5 ml deasupra peletei de celule (sau de 2 ori volumul peletei) din lichidul amniotic centrifugat. Repartizați în părți alicote supernatantul (cel puțin 1 ml, dacă este posibil) pentru analizele de alfa-fetoproteină (AFP) și acetilocolin-esterază, dacă este necesar. Dacă proba conține sânge, pregătiți o parte alicotă suplimentară pentru analize ulterioare. Resuspendați peleta de celule într-un volum mic din propriul lichid amniotic al pacientei. Adăugați 4 ml de CHANG Amnio la un volum total de 5 ml per flacon. Dacă proba se obține de la o pacientă aflată în al treilea trimestru al sarcinii, peleta poate fi mai mare, dar poate conține mai puține celule viabile, necesitând astfel o însămănțare mai puternică (mai puțin mediu decât în mod normal).

3. Incubați culturile fără a le agita la 37 °C într-o atmosferă de 5 - 8 % de CO₂.

- Controlați culturile pentru a vedea dacă există creștere în/sau după ziua 5 și recoltați atunci când se observă suficiente colonii.
- Cele mai bune rezultate se obțin atunci când culturile sunt hrănite cu CHANG Amnio în ziua anterioară recoltării.
- Centrifugați lichidul amniotic la aproximativ 1.200 rpm timp de 10 minute pentru a concentra celulele.
- Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă, lăsând aproximativ 0,5 ml deasupra peletei de celule (sau de 2 ori volumul peletei) din lichidul amniotic centrifugat. Repartizați în părți alicote supernatantul (cel puțin 1 ml, dacă este posibil) pentru analizele de alfa-fetoproteină (AFP) și acetilocolin-esterază, dacă este necesar. Dacă proba conține sânge, pregătiți o parte alicotă suplimentară pentru analize ulterioare. Resuspendați peleta de celule într-un volum mic din propriul lichid amniotic al pacientei. Adăugați 4 ml de CHANG Amnio la un volum total de 5 ml per flacon. Dacă proba se obține de la o pacientă aflată în al treilea trimestru al sarcinii, peleta poate fi mai mare, dar poate conține mai puține celule viabile, necesitând astfel o însămănțare mai puternică (mai puțin mediu decât în mod normal).
- Incubați culturile fără a le agita la 37 °C într-o atmosferă de 5 - 8 % de CO₂.
- Controlați culturile pentru a vedea dacă există creștere și înlocuiți în continuare complet mediul în fiecare zi până când se observă suficiente colonii și acestea sunt gata pentru recoltare. Pentru probele care conțin sânge, culturile pot necesita înlocuiri mai frecvente ale mediului.
- Cele mai bune rezultate se obțin atunci când culturile sunt hrănite cu CHANG Amnio în ziua anterioară recoltării.

10. Stabiliți numărul minim de culturi folosind 0,5 ml de CHANG Amnio per cultură pentru fiecare vas Petri care conține o lamelă.

11. Incubați culturile fără a le agita la 35 - 39 °C într-o atmosferă de 5 - 8 % CO₂.

12. Înundați culturile în ziua 2 prin adăugarea a 1,5 ml de CHANG Amnio preîncălzit.

13. După 4 zile, culturile ar trebui verificate pentru a se vedea dacă există creștere. Dacă se observă creștere, îndepărtați mediul și adăugați 2 ml de CHANG Amnio proaspăt preîncălzit la fiecare lamelă. În continuare culturile ar trebui hrănite la fiecare 2 zile. Pentru probele care conțin sânge, culturile pot necesita înlocuiri mai frecvente ale mediului.

14. Controlați culturile pentru a vedea dacă există creștere în ziua 5 și recoltați atunci când se observă suficiente colonii. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când culturile sunt hrănite cu CHANG Amnio în ziua anterioară recoltării.

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

A se depozita la o temperatură sub -10 °C. Produsul este stabil până la data de expirare indicată pe eticheta de pe flacon când este depozitat congelat. Produsul neutilizat poate fi transferat în părți alicote de lucru și recongelat pentru utilizare ulterioară sau închis ermetic și depozitat la o temperatură între 2 °C și 8 °C timp de până la 30 de zile; el poate fi congelat de maximum două ori. Protejați de lumina fluorescentă.

PRECAUȚII ȘI AVERTISEMENTE

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

Nu utilizați niciun flacon al cărui ambalaj steril a fost deteriorat.

Nu utilizați CHANG Amnio după data expirării indicată pe eticheta individuală.

SVENSKA

INDIKATIONER

CHANG Amnio med gentamicin och L-glutamin kan användas för följande tillämpningar:

- 1. primärödling av celler i amnionvätska
- 2. odling av celler från amnionvätska från passage
- 3. fast amnionvävad från chorionvillbiopsi.

Detta medium har tagits fram för användning i en CO₂-inkubator (kulturerna ekvilibreras i en atmosfär med 5–8 % CO₂).

Det slutliga pH-värdet måste vara 6,65–7,44. Se bruksanvisningen.

PRODUKTBESKRIVNING

CHANG Amnio är ett komplett medium som är färdigt att användas för primärödling av celler i human amnionvätska (AFC), chorionvillbiopsi (CVS) och konceptionsprodukter (POC) för karyotypbestämning och andra antenatala genetiska tester. Det har optimerats för både flask- och in situ-metoder. Denna produkt innehåller antibiotikat gentamicinsulfat (50 µg/ml).

KOMPONENTER

Bufferar	Proteiner, hormoner samt tillväxtfaktorer	Nukleinsyror
Natriumbikarbonat	Fetalt bovint serum (FBS)	Deoxiadenosin
Antioxidant	Serum från nyfödda kalvar	Deoxicytidin
Tiotkinsyra	Humant transferrin	Deoxiguanosin
Antibiotikum	Fibroblasttillväxt-faktor (FGF)	Adenosin
Gentamicinsulfat	Insulin	Cytidin
Aminosyror	Progesteron	Guanosin
Alanin	Testosteron	Uridin
Arginin	Betadestradiol	Övrigt
Asparagin	Hydrokortison	Etylalkohol
Asparaginsyra		Tyrosin
Cystein		
Glutaminsyra	pH-indikator	Vitaminer och spårämnen
Glutamin	Fenolrött	Askorbinsyra
Glycin		Folsyra
Histidin	Energisubstrat	Nikotinamid
Isoleucin	Glukos	Riboflavin
Leucin	Pyruvat	Tiamin
Lysin	Inositol	Pantotensyra
Metionin		Kobalamin
Fenylalanin	Salter och joner	Pyridoxin
Prolin	Natriumklorid	Biotin
Serin	Natriumselenit	
Treonin	Kalciumklorid	Vatten
Tryptofan	Kolinklorid	Vatten för injektion (WFI)
Tyrosin	Kaliumklorid	
Valin	Kaliumfosfat	
	Magnesiumsulfat	
	Natriumfosfat	

KVALITETSSÄKRING
STERILITET

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

BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

Tina upp mediet vid rumstemperatur på en steril arbetsbänk eller genom att placera flaskan i ett 37 °C vattenbad.

CHANG Amnio innehåller gentamicin (50 mg/l). Ytterligare antibiotika kan tillsättas om så önskas.

ALIKVOTERING AV CHANG Amnio

- 1. Tina upp CHANG Amnio enligt ovanstående anvisningar.
- 2. Fördela mediet aseptiskt i alikvoter av lämplig storlek och frys ner dem på nytt.
- 3. Tina upp alikvoterna i ett 37 °C vattenbad när de ska användas.

BRUKSANVISNING

Användning av CHANG Amnio för primärkulturer: in situ-metoder

- 1. Centrifugera amnionväskan vid cirka 1 200 rpm under 10 minuter för att koncentrera cellerna.
- 2. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar cirka 0,5 ml av den centrifugerade amnionvätskan (eller cirka 2 x pelletens volym) ovanför cellpelleten. Alikvoter supernatanten (minst 1 ml om möjligt) för analys av alfafetoprotein (AFP) och acetylkolinesteras, om så krävs. Vid blodigt prov ska en extra alikvot prepareras för ytterligare testning. Resuspendera cellpelleten i en liten volym av patientens egen amnionvätska. Tillsätt tillräckligt med CHANG Amnio till den koncentrerade celluspensionen för att möjliggöra en slutlig plattvolym på 0,5 ml per täckglas (totalt 4 täckglas beroende på cellpelletens storlek), eller 2 ml per flaska. Om det erhållna provet härrör från en patient i tredje trimestern kan pelleten eventuellt vara större men innehålla färre viabla celler och därför kräva kraftigare utsädd (mindre medium än normalt).
- 3. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 37 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär.
- 4. Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 2 ml CHANG Amnio.
- 5. Efter 4–5 dagar bör kulturerna kontrolleras med avseende på växt. Näring bör tillföras till kulturerna så snart växt har observerats. Tillför näring till kulturerna genom att avlägsna all supernatant från kulturen och ersätta den med 2 ml färskt CHANG Amnio. Det rekommenderas att därefter tillföra näring till kulturerna varannan dag. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
- 6. Kontrollera kulturerna med avseende på växt på eller efter dag 5 och skörda dem när tillräckligt många kolonier observeras.
- 7. Bästa resultat erhålls när kulturerna tillförs näring med CHANG Amnio dagen innan de skördas.

Användning av CHANG Amnio för primärkulturer: Metoder med flaska

- 1. Centrifugera amnionväskan vid cirka 1 200 rpm under 10 minuter för att koncentrera cellerna.
- 2. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar cirka 0,5 ml av den centrifugerade amnionvätskan (eller cirka 2 x pelletens volym) ovanför cellpelleten. Alikvoter supernatanten (minst 1 ml om möjligt) för analys av alfafetoprotein (AFP) och acetylkolinesteras, om så krävs. Vid blodigt prov ska en extra alikvot prepareras för ytterligare testning. Resuspendera cellpelleten i en liten volym av patientens egen amnionvätska. Tillsätt 4 ml CHANG Amnio till en total volym på 5 ml per flaska. Om det erhållna provet härrör från en patient i tredje trimestern kan pelleten eventuellt vara större men innehålla färre viabla celler och därför kräva kraftigare utsädd (mindre medium än normalt).
- 3. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 37 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär.
- 4. Kontrollera kulturerna med avseende på växt på dag 5. Byt ut mediet mot 2 ml färskt CHANG Amnio och skörda om tillräcklig cellväxt observeras.
- 5. Kontrollera kulturerna med avseende på växt och byt därefter helt ut mediet varje dag tills tillräckligt med kolonier observeras och är klara att skördas. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
- 6. Bästa resultat erhålls när kulturerna tillförs näring med CHANG Amnio dagen innan de skördas.

Användning av CHANG Amnio för odling av celler från amnionvätska från passage:

För passage av cellerna, behandla kulturerna med trypsin (eller pronas etc.) så som normalt sker vid odling av celler i konventionellt medium. Proteasbehandlingen bör dock nog övervakas. Celler från amnionvätska som odlas i CHANG Amnio tenderar att vara känsligare för proteasbehandling än vid odling i konventionellt medium. Ert protokoll kan behöva modifieras för att ta hänsyn till detta.

Amnion pH i det medium som används som näringssubstrat till kulturerna måste vara mellan 6,65–7,44 (dvs. mediet måste ha en svagt gulaktig laxfärg). pH kan lätt justeras genom att mediet placeras i en 5–8 % CO₂-inkubator med locket något lossat, under cirka 30 minuter.

Anm: Vid upptining av Chang Amnio kan en viss mängd kalciumoxalat- och proteinfällningar bildas. Dessa fällningar har inte visats utöva någon effekt på produktens funktion.

Preparering av prov från chorionvillbiopsi:

- 1. Märk en petriskål för varje erhållt prov och överför biopsiinnehållet med aseptisk teknik. Tillsätt 5 ml av det förvämda CHANG Amnio komplett medium till skålen och ställ in skålen i inkubatorn i 30 minuter vid 35–39 °C, 5–8 % CO₂-atmosfär, för att låta blodet sjunka till botten.
- 2. Rensa provet under ett dissektionsmikroskop, först med 1,5X förstoring och därefter med cirka 3X förstoring. Anm: En mängd på cirka 20–40 mg chorionvillbiopsi krävs.
- 3. Arbeta i skålen under dissektionsmikroskopet och avlägsna blodkoagler och eventuellt maternell decidua från villusmaterialet med hjälp av två par sterila pincetter. Villusmaterial har ljus färg, är tubulärt och/ eller hopklumpat med synliga grenar och vener.
- 4. Överför rena villi till en annan petriskål med förvämt CHANG Amnio komplett medium. Utför en slutlig rensning genom att fatta tag i villi med en pincett och försiktigt skaka dem. Anm: Idealisk mängd är 5 mg per kultur. Undvik noga att skada de sköra villi.
- 5. Överför villi och medium till ett 15 ml centrifugrör och tillsätt 4 droppar antibiotikum (dvs. gentamicinsulfat , 50 µl/ml) till centrifugröret. Låt stå i 30 minuter.
- 6. Centrifugera villi vid cirka 1 400 rpm under 5 minuter.

Odling av chorionvillbiopsi:

- 1. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men se till att lämna kvar cirka 0,5 ml medium (eller cirka 2 X cellpelletens volym) ovanför cellpelleten.
- 2. Resuspendera pelleten försiktigt. Tillsätt 2 ml förvämt CHANG Amnio-medium till centrifugröret.
- 3. Tillsätt 2 ml trypsin EDTA och inkubera kulturerna, utan att störa dem, i 10 minuter vid 35–39 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär. Ta ut röret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och placera röret i inkubatorn i 10 minuter till.
- 4. Ta ut centrifugröret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och centrifugera i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
- 5. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret. Resuspendera pelleten, tillsätt därefter 1 ml kollagenas till röret och sätt in röret i inkubatorn i 5 minuter.
- 6. Ta ut röret ur inkubatorn och se efter om pelleten är grumlig och att inga distinkta stycken av enstaka villi kan ses. Om pelleten inte är grumlig, sätt tillbaka röret i inkubatorn i 5 minuter till.
- 7. Tillsätt 3 ml förvämt CHANG Amnio till centrifugröret för att stoppa kollagenasets aktivitet.
- 8. Centrifugera röret i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
- 9. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar 0,5 ml medium ovanför cellpelleten. Resuspendera pelleten före tillsättning av CHANG Amnio som använts för preparering.
- 10. Preparera ett optimalt antal kulturer med användning av 0,5 ml CHANG Amnio per kultur för varje petriskål som innehåller ett täckglas.
- 11. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 35–39 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär.
- 12. Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 1,5 ml förvämt CHANG Amnio.
- 13. Efter 4 dagar bör kulturerna kontrolleras med avseende på växt. Om växt observeras, avlägsna mediet och tillsätt 2 ml färskt förvämt CHANG Amnio till varje täckglas. Kulturerna bör därefter tillföras näring varannan dag. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
- 14. Kontrollera kulturerna med avseende på växt på dag 5 och skörda när tillräckligt många kolonier observeras. Bästa resultat erhålls när kulturerna tillförs näring med CHANG Amnio dagen innan de skördas.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvaras fryst vid temperatur under –10 °C. Vid frysförvaring är produkten hållbar fram till det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Oanvänd produkt kan 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. Den får frysas högst två gånger. 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. Flaskor vars sterila förpackning inte är intakt får inte användas.

Använd inte CHANG Amnio efter det utgångsdatum som anges på etiketten.

LIETUVIŲ K.

NAUDOJIMO INDIKACIJA

Gentamicinu ir L glutaminu papildyta „CHANG Amnio“ terpė gali būti naudojama pagal tokią paskirtį:

1. amniono skyčio lašelių pirminei kultiūrai;
2. auginant perkeltus amniono skyčio lašteles;
3. tvirto amniono audiniui, gautam paėmus chorioninių išaugų (gaurelių) mėginius.

Ši terpė buvo sukurta naudoti CO₂ inkubatoriuose (pasėlių pusiausvyros būseną pasiekia 5–8 % CO₂ aplinkoje).

Galutinė pH reikšmė turi būti 6,65–7,44. Žr. Naudojimo nurodymus.

ITAISO APRAŠYMAS

„CHANG Amnio“ – tai visos sudėties paruošta naudoti terpė, skirta pirminei žmogaus vaisiaus vandenų lašelių (AFC) kultūrai auginti, chorionbiopsijai (CVS) ir apvaisinimo produktams (POC) atliekant kariotipavimo ir kitus antenatalinius genetinius tyrimus. Jos sudėtis yra optimizuota tiek kultivuoti flakonuose, tiek *in situ* metodais. Šio produkto sudėtyje yra antibiotiko gentamicino sulfato (50 µg/ml).

SUDEAMOSIOS DALYS		
Buteriai	Baltymai, hormonai	Magnio sulfatas
Natrio bikarbonatas	ir augimo faktoriai	Natrio fosfatas
	Jaucio embriono	
Antioksidantas	kraujo serumas	Nukleino rūgštys
Lipo rūgštis	(FBS)	Deoksiadenozinas
Antibiotikas	Jaucio naujagimio	Deoksitidinas
Gentamicino sulfatas	kraujo serumas	Dezoksiguanozinas
	Žmogaus	Adenozinas
	transferinas	Citidinas
	Fibroblasto augimo	Guanozinas
	faktoriaus (FGF)	Timidinas
Amionorūgštis	Insulinas	Uridinas
Alaninas	Progesteronas	
Argininas	Testerosteronas	Kita
Asparaginas	Beta estradiolis	Etilo alkoholis
Asparto rūgštis	Cisteinas	Hidroksizonas
Cisteinas	Glutamo rūgštis	
Glutamo rūgštis	pH indikatorius	Vitaminai
Glutaminas	Fenolio raudonasis	ir mikroelementai
Glicinas		Askorbo rūgštis
Histidinas		Folio rūgštis
Izoleucinas		Nikotinamidas
Leucinas	Energetiniai	Riboflavinas
Lizinas	substratai	Glukozė
Metioninas	Piruvatas	Tiaminas
Fenilalaninas	Inozitolis	Pantotinė rūgštis
Prolinas		Kobalaminas
Serinas	Druskos ir jonai	Piridoksinas
Treoninas	Natrio chloridas	Biotinas
Triptofanas	Natrio selenitas	
Tirozinas	Kalcio chloridas	Vanduo
Valinas	Cholino chloridas	Injekcinio vandens
	Kalio chloridas	kokybė
	Kalio fosfatas	

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

STERILUMAS

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

PARUOŠIMAS NAUDOTI

Atitirpinkite ant sterilaus stališvio kambario temperatūroje arba įdėdami buteliuką į 37 °C vandens vonelę.

„CHANG Amnio“ terpės sudėtyje yra gentamicino sulfato (50 mg/l). Prireikus galima pridėti papildomų antibiotikų.

„CHANG Amnio“ DALIJIMAS Į PORCIJAS

1. Atitirpinkite „CHANG Amnio“ terpę pagal nurodymus.
2. Aseptiškai paskirstykite į patogaus naudoti dydžio alikvotines dalis ir pakartotinai užšaldykite.
3. Kai būsite pasirėngę naudoti, atšildykite alikvotines dalis 37 °C temperatūros vandens vonelėje.

NAUDOJIMO NURODYMAI

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas pirminiams pasėliams: *in situ* metodologijos

1. Vaisiaus vandenį 10 minučių centrifuguokite esant 1200 aps./min koncentruotai lašelių masei gauti.
2. Nusiurbkite centrifuguotų vaisiaus vandenų supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami apyt. 0,5 ml virš lašelių nuosėdų (arba apie 2 k. už nuosėdų tūrį didesnį kiekį). Jei reikia, padalykite supernatantą (jei įmanoma, bent 1 ml porcijomis) alfa-fetoproteinų (AFP) ir acetilcholinesterazės tyrimams. Jei mėginys kraujingas, paruoškite papildomą porciją tolesniems tyrimams. Nusėdusias lašteles resuspenduokite nedideliame pačios pacientės vaisiaus vandenų kiekyje. Į koncentruotą lašelių suspensiją pridėkite pakankamai „CHANG Amnio“ terpės, kad galutinis po kiekvienos plokštelės dengiamuoju stikliu tenkantis tūris būtų 0,5 ml (iš viso 4 dengiamieji stikliai, priklausomai nuo lašelių nuosėdų) arba po 2 ml vienam flakonėliui. Jei mėginys paimtas iš pacientės trečiąjį nėštumo trimestrą, lašelių nuosėdos gali būti didesnės, tačiau jose yra mažiau gyvybingų lašelių, todėl reikia daugiau pasėti (mažiau terpės nei įprastai).
3. Pasėlius netrukdomai inkubukite 37 °C temperatūroje 5–8 % CO₂ aplinkoje.
4. 2–ą dieną ant kultūrų užliekite po 2 ml „CHANG Amnio“ terpės.
5. Praėjus 4–5 dienoms, reikia patikrinti kultūrų augimą. Pastebėjus, kad kultūros auga, jas reikia maitinti. Kultūras maitinkite nusiurbdami visą virš pasėlio susidariusį supernatantą ir jį pakeisdami 2 ml šviežios „CHANG Amnio“ terpės. Po to kultūras rekomenduojama maitinti kas 2 dienas. Jei mėginiai buvo kraujingi, kultūroms gali prireikti dažniau keisti terpę.
6. 5–ą dieną arba po 5 dienų patikrinkite kultūrų augimą ir aptikę pakankamai kolonijų lašteles surinkite.
7. Geriausių rezultatų pasiekama „CHANG Amnio“ terpe pasėlius maitinant dieną prieš lašelių surinkimą.

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas pirminėms kultūroms: Kolbos metodologijos

1. Vaisiaus vandenį 10 minučių centrifuguokite esant 1200 aps./min koncentruotai lašelių masei gauti.
2. Nusiurbkite centrifuguotų vaisiaus vandenų supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami apyt. 0,5 ml virš lašelių nuosėdų (arba apie 2 k. už nuosėdų tūrį didesnį kiekį). Jei reikia, padalykite supernatantą (jei įmanoma, bent 1 ml porcijomis) alfa-fetoproteinų (AFP) ir acetilcholinesterazės tyrimams. Jei mėginys kraujingas, paruoškite papildomą porciją tolesniems tyrimams. Nusėdusias lašteles resuspenduokite nedideliame pačios pacientės vaisiaus vandenų kiekyje. Įpilkite 4 ml „CHANG Amnio“ terpės, kad kiekviename flakone susidarytų bendras 5 ml tūris. Jei mėginys paimtas iš pacientės trečiąjį nėštumo trimestrą, lašelių nuosėdos gali būti didesnės, tačiau jose yra mažiau gyvybingų lašelių, todėl reikia daugiau pasėti (mažiau terpės nei įprastai).
3. Pasėlius netrukdomai inkubukite 37 °C temperatūroje 5–8 % CO₂ aplinkoje.
4. 5-ąją dieną patikrinkite augimą. Terpę pakeiskite 2 ml šviežios „CHANG Amnio“ terpės ir pastebėję pakankamai priaugusių lašelių jas surinkite.
5. Tikrinkite kultūrų augimą ir kasdien visiškai keiskite terpę, kol pastebėsite, kad užaugo pakankamai kolonijų ir jas galima imti. Jei mėginiai buvo kraujingi, kultūroms gali prireikti dažniau keisti terpę.
6. Geriausių rezultatų pasiekama „CHANG Amnio“ terpe pasėlius maitinant dieną prieš lašelių surinkimą.

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas persėtoms vaisiaus vandenų laštelėms auginti:

Persėdami lašteles, kultūras apdorokite tripsinu (arba pronaze ar kt.), kaip kad paprastai darytumėte augindami lašteles įprastinėje terpėje. Tačiau proteazės procedūrą reikia atidžiai stebėti. „CHANG Amnio“ terpėje augintos vaisiaus vandenų laštelės turi didesnį polinkį jautriau reaguoti į apdorojimą proteazėmis negu įprastinėje terpėje augintos vaisiaus vandenų laštelės. Gali prireikti pakeisti protokolą, kad galėtumėte atsižvelgti į šį faktą.

Pastaba. Pasėliams maitinti naudojamoms terpės rūgštumas turi būti pH 6,65–7,44 (t. y. terpė turi būti šiek tiek gelsvai lašišinės spalvos). pH galima lengvai pakoreguoti terpę apie 30 minučių palaikant 5–8 % CO₂ inkubatoriuje su šiek tiek atsuktu dangteliu.

Pastaba. Atitirpinus „Chang Amnio“ terpėje gali susidaryti tam tikrų kalcio oksalato ir baltymų nuosėdų. Nežinoma, ar šios nuosėdos turi įtakos produkto veikimui.

- Chorioninių gaurelių mėginio paruošimas**
1. Pažymėkite kiekvieno gauto mėginio petri lėkštelę ir steriliiu būdu perkeltike mėginio turinį. Pridėkite į lėkštelę 5 ml pašildytos „CHANG Amnio“ visapusiškos terpės ir įdėkite į inkubatoriu 30 minučių 35–39 °C temperatūroje, 5–8 % CO₂ aplinkoje, kad kraujas nusistovėtų.
 2. Išvalykite mėginį, naudodami preparavimo lupą, pradžioje didindami 1,5 karto, po to didindami maždaug 3 kartus. Pastaba. Reikia maždaug 20–40 mg chorioninių gaurelių mėginio.
 3. Dviem steriliomis žnyplėmis išimkite kraujo krešulius ir bet kokius placentos likučius iš gaurelių, dirbdami lėkštelėje po preparavimo lupą. Gaurelių medžiaga yra šviešios spalvos, kanėliū ir (arba) gumulėlių formos su matomomis atšakomis ir venomis.
 4. Perkelkite švarius gaurelius į kitą petri lėkštelę, kurioje yra pašildyta „CHANG Amnio“ visos sudėties terpė. Atlikite baigiamąjį valymą, žnyplėmis suimkite gaurelius ir švelniai pamaišykite. Pastaba. Vienam pasėliui būtų tinkamiausia naudoti 5 mg kiekį. Saugokitės, kad nepažeistumėte trapių gaurelių.
 5. Perkelkite gaurelius ir terpę į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlį ir įlašinkite 4 lašus antibiotiko (t. y. gentamicino sulfato, 50 µl/ml) į centrifugavimo mėgintuvėlį. Palaukite 30 minučių.
 6. Centrifuguokite gaurelius 5 minutes esant apyt. 1400 aps./min.

- Chorioninių gaurelių mėginio pasėlis
1. Nusiurbkite viršnuosėdinį skystį iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami 0,5 ml terpės virš lašelių nuosėdų (arba apie 2 k. už lašelių nuosėdų tūrį didesnį kiekį).
 2. Atsargiai resuspenduokite nuosėdas. Į centrifuginį mėgintuvėlį įpilkite 2 ml pašildytos „CHANG Amnio“ terpės.
 3. Įpilkite 2 ml tripsino EDTA ir pasėlį netrukdomai 10 minučių inkubukite 35–39 °C temperatūroje 5–8 % CO₂ aplinkoje. Išimkite mėgintuvėlį iš inkubatoriaus, resuspenduokite lašelių nuosėdas ir padėkite į inkubatoriu dar 10 minučių.
 4. Išimkite centrifuginį mėgintuvėlį iš inkubatoriaus, resuspenduokite lašelių nuosėdas ir 8–10 minučių centrifuguokite 1400 aps./min. greičiu.
 5. Nusiurbkite supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio. Resuspenduokite lašelių nuosėdas, tada į mėgintuvėlį įpilkite 1 ml kolagenazės ir padėkite į inkubatoriu 5 minutėms.
 6. Išimkite iš inkubatoriaus ir apžiūrėkite, ar lašelių nuosėdos drumstos ir ar nesimato atskirų gaurelių dalių. Jei lašelių nuosėdos nedrumstos, padėkite atgal į inkubatoriu dar 5 minutėms.
 7. Įpilkite 3 ml pašildytos „CHANG Amnio“ terpės į centrifuginį mėgintuvėlį, kad kolagenazė būtų sustabdyta.
 8. Mėgintuvėlį 8–10 minučių centrifuguokite 1400 aps./min. greičiu.
 9. Nusiurbkite viršnuosėdinį skystį iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami 0,5 ml terpės virš lašelių nuosėdų. Prieš įpildami paruošti naudotos „CHANG Amnio“ terpės resuspenduokite lašelių nuosėdas.
 10. Nustatykite optimalų kultūrų skaičių, naudodami 0,5 ml „CHANG Amnio“ kultūrai kiekvienoje petri lėkštelėje su dengiamuoju stikliu.
 11. Pasėlius netrukdomai inkubukite 35–39 °C temperatūroje 5–8 % CO₂ aplinkoje.
 12. 2-ą dieną ant pasėlių užliekite po 1,5 ml pašildytos „CHANG Amnio“ terpės.

13. Praėjus 4 dienoms, reikia patikrinti kultūrų augimą. Pastebėję lašelių augimą, pašalinkite terpę ir po kiekvieno dengiamuojų stikliu pridėkite 2 ml šviežios pašildytos „CHANG Amnio“ terpės. Po to kultūras maitinkite kas 2 dienas. Jei mėginiai buvo kraujingi, kultūroms gali prireikti dažniau keisti terpę.
14. 5-ą dieną patikrinkite kultūrų augimą ir aptikę pakankamai kolonijų lašteles surinkite. Geriausių rezultatų pasiekama „CHANG Amnio“ terpe pasėlius maitinant dieną prieš lašelių surinkimą.

LAIKYMAS IR STABILUMAS

Laikykite užšaldytą –10 °C temperatūroje. Laikant užšaldytą, produktas išlieka stabilus iki tinkamumo datos, pažymėtos butelio etiketėje. Nesunaudotą produkto likutį galima išpilstyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti vėlesniam naudojimui arba sandariai uždengus laikyti 2 °C–8 °C temperatūroje iki 30 dienų; galima užšaldyti daugiausia du kartus. Saugoti nuo fluorescencinių spindulių.

ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

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

Nenaudokite produkto, jei pažeista sterili buteliuko pakuotė.

Nenaudokite „CHANG Amnio“ terpės pasibaigus etiketėje nurodytam galiojimo laikui.

TÜRKÇE

KULLANIM ENDİKASYONU

Gentamisin ve L-Glutaminli CHANG Amnio şu uygulamalar için kullanılabilir:

- amniyotik sıvı hücrelerinin primer kültürü
- pasaj yapılmış amniyotik sıvı hücrelerini üretme
- koryonik villus örneklemesinden solid amniyotik doku.

Bu vasat CO₂ inkübatörlerinde (%5 - %8 CO₂ atmosferinde dengelenmiş kültürler) kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Son pH 6,65 - 7,44 olmalıdır. Lütfen Kullanma Talimatına başvurun.

ÇIHAZ TANIMI

CHANG Amnio karyotipleme ve diğer prenatal genetik testlerde kullanılmak üzere insan amniyotik sıvı hücreleri (AFC), koryonik villus örnekleme (CVS) ve konsepsiyon ürünlerinin (POC) primer kültürü için komple, kullanıma hazır bir vasattır. Hem flask hem in situ metodolojileri için optimize edilmiştir. Bu ürün Gentamisin Sülfat antibiyotigini (50 µg/mL) içerir.

	BİLEŞENLER	
Tamponlar Sodyum bikarbonat	Proteinler Hormonlar ve Büyüme Faktörleri Fetal siğir serumu (FSS) Yenidoğan siğir serumu İnsan transferini Fibroblast büyüme faktörü (FGF) İnşülin Progesteron Testosteron Beta estradiol Hidrokortizon	Magnezyum sülfat Sodyum fosfat
Antioksidan Tiyotik asit	Nükleik asitler Deoksiaadenozin Deoksisitidin Deoksiguanozin Sitidin Guanozin Timidin Üridin	
Antibiyotik Gentamisin Sülfat	Diğer Etil alkol Tironin	
Amino Asit Alanin Arlinin Asparajin Aspartik Asit Sistein Glutamik Asit Glutamin Glisin Histidin İzoösin Lösin Lizin Metiyonin Fenilalanin Prolin Serin Treonin Triptofan Tirozin Valin	pH Göstergesi Fenol kırmızısı	
	Vitaminler ve eser elementler Askorbik asit Folik asit Nikotinamid Riboflavin Tiyamin Pantotetik asit Kobalamin Piridoksin Biyotin	
	Enerji Substratları Glukoz Piruvat İnositol	
	Tuzlar ve İyonlar Sodyum klorür Sodyum selenit Kalsiyum klorür Kolin klorür Potasyum klorür Potasyum fosfat	
		Su Enjeksiyonluk Su Kalitesi

KALİTE GÜVENÇE

STERİLİTE

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

KULLANIM HAZIRLIĞI

Oda sıcaklığında steril bir tezgah üstünde veya şişeyi 37°C su banyosuna yerleştirerek çözün.

CHANG Amnio, gentamisin (50 mg/L) içerir. İstenirse ek antibiyotikler eklenebilir.

CHANG Amnio ALIKOTLAMA

- CHANG Amnio ürününü yukarıdaki talimata göre çözün.
- Uygun büyüklükte alikotlara aseptik olarak dağıtın ve tekrar dondurun.
- Alikotları kullanmaya hazır olduğunuzda 37°C su banyosunda çözün.

KULLANMA TALİMATI

Primer Kültürler için CHANG Amnio Kullanımı: *in situ* Metodolojiler

- Hücreleri konsantre etmek için amniyotik sıvıyı 10 dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüleyin.
- Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) santrifüje edilmiş amniyotik sıvı bırakın. Gerekirse alfa-fetoprotein (AFP) ve asetil kolinesteraz testleri için süpernatanı alikotlayın (mümkünse en az 1 mL). Numune kanlıysa ek testler için ek bir alikot hazırlayın. Hücre pelletini hastanın kendi amniyotik sıvısının küçük bir miktarında tekrar süspansiyon haline getirin. Konsantre hücre süspansiyonuna lamel başına 0,5 mL (hücre pelleti büyüklüğüne bağlı olarak toplam 4 lamel) veya flasket başına 2 mL olacak şekilde sun plakalama hacmini mümkün kılmak üzere yeterli CHANG Amnio ekleyin. Numune gebeliğin 3. trimesterindeki bir hastadan alınırsa pellet daha büyük olabilir ama daha az canlı hücre içerebilir ve bu nedenle daha yoğun tohumlama gerektirebilir (normalden daha az vasat).
- Kültürleri ellemeden 37°C'de %5 - %8 CO₂ atmosferi altında inkübe edin.
- Kültürleri gün 2'de 2 mL CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıya dönmeye örtün.
- Kültürlerin 4 - 5 günden sonra üreme açısından kontrol edilmesi gerekir. Kültürler üreme gözlemlenden sonra beslenmelidir. Kültürleri tüm kültür süpernatanını alıp yerine 2 mL yeni CHANG Amnio koyarak besleyin. Kültürlerin bundan sonra 2 günde bir beslenmesi önerilir. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gereklidir.
- Kültürleri 5. günden sonra üreme için kontrol edin ve yeterli koloni gözlenince toplayın.
- En iyi sonuçlar kültürlerin toplama öncesi günde CHANG Amnio ile beslenmesiyle alınır.

Primer Kültürler için CHANG Amnio Kullanımı: Flask Metodolojileri

- Hücreleri konsantre etmek için amniyotik sıvıyı 10 dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüleyin.
- Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) santrifüje edilmiş amniyotik sıvı bırakın. Gerekirse alfa-fetoprotein (AFP) ve asetil kolinesteraz testleri için süpernatanı alikotlayın (mümkünse en az 1 mL). Numune kanlıysa ek testler için ek bir alikot hazırlayın. Hücre pelletini hastanın kendi amniyotik sıvısının küçük bir miktarında tekrar süspansiyon haline getirin. Flask başına toplam 5 mL hacim için 4 mL CHANG Amnio ekleyin. Numune gebeliğin 3. trimesterindeki bir hastadan alınırsa pellet daha büyük olabilir ama daha az canlı hücre içerebilir ve bu nedenle daha yoğun tohumlama gerektirebilir (normalden daha az vasat).
- Kültürleri ellemeden 37°C'de %5 - %8 CO₂ atmosferi altında inkübe edin.
- Gün 5'te üreme için kontrol edin. Vasatı 2 mL yeni CHANG Amnio ile değiştirin ve yeterli hücre üretmesi gözlenirse toplayın.
- Kültürlerin üreme durumunu kontrol edin ve bundan sonra yeterli koloni gözlenince ve toplamaya hazır olana kadar her gün vasatı tamamen değiştirin. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
- En iyi sonuçlar kültürlerin toplama öncesi günde CHANG Amnio ile beslenmesiyle alınır.

Pasaj Yapılmış Amniyotik Sıvı Hücrelerini Büyütmek için CHANG Amnio kullanımı:

Hücre pasajı yapmak için kültürlere hücreler geleneksel vasatta üretilirdiğinde normalde yapacağınız gibi tripsin (veya Pronase vs.) muamelesi yapın. Ancak proteaz tedavisi dikkatle izlenmelidir. CHANG Amnio içinde büyütülen amniyotik sıvı hücreleri geleneksel vasatta büyütülönlere göre proteaz tedavisine daha duyarlı olma eğilimindedir. Protokolünüzü bunu hesaba alacak şekilde değiştirmeye gerekebilir.
Not: Kültürleri beslemek için kullanılan vasatın pH değeri 6,65 - 7,44 olmalıdır (yani vasat hafif sarımsı pembe olmalıdır). pH değeri, vasatı kapagı gevşettilmiş olarak yaklaşık 30 dakika boyunca bir %5 - %8 CO₂ inkübatörüne yerleştirerek kolayca ayarlanabilir.

Not: Chang Amnio ürününde çözme sonrasında bir miktar Kalsiyum Oksalat ve protein presipitatu gelişebilir. Bu presipitatların ürün performansı üzerine bir etkisi bilinmemektedir.

Koryonik Villus Örneği Hazırlama:

- Alınan her numune için bir petri tabağını etiketleyin ve örnek içeriğini aseptik olarak aktarın. Tabağa 5 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio komple vasatından ekleyin ve kanın coğkmesini sağlamak üzere 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO₂ atmosferinde bir inkübatöre 30 dakika yerleştirin.
- Numuneyi bir diseksiyon mikroskobu altında başlangıçta 1,5x büyütmeyle ve sonra yaklaşık 3x büyütmeyle temizleyin. Not: Yaklaşık 20 - 40 mg koryonik villus örneği gerekecektir.
- Ki steril forseps kullanarak diseksiyon mikroskobu altında tabak içinde çalışma yoluyla villus materyalinden herhangi bir maternal desidia materyalini ve kan phtılarını giderin. Villus materyali görünür dallar ve toplardamarlarla birlikte açık renkli ve tübüler ve/veya topaklı durumdur.
- Temiz villusları önceden ısıtılmış CHANG Amnio komple vasatı içeren başka bir petri tabağına aktarın. Villusları tutup yavaşça ajitasyon yapmak için forseps kullanarak son bir temizlik yapın. Not: Kültür başına kullanmak için ideal miktar 5 mg'dır. Narin villuslara zarar vermekten kaçınmak için dikkatli olun.
- Villuslar ve vasatı bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın ve santrifüj tüpüne 4 damla antibiyotik (örn. Gentamisin Sülfat, 50 µL/mL) ekleyin. 30 dakika bırakın.
- Villusları 5 dakika boyunca yaklaşık 1400 devir/dk hızında santrifüleyin.

Koryonik Villus Örneği Kültürü:

- Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) vasat bıraktığınızdan emin olun.
- Pelleti yavaşça tekrar süspansiyon haline getirin. Santrifüj tüpüne önceden ısıtılmış 2 mL CHANG Amnio vasatı ekleyin.
- 2 mL Tripsin EDTA ekleyin ve kültürü bozulmadan 10 dakika boyunca 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO₂ atmosferi altında inkübe edin. Tüpü inkübatörden çıkarın, pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve inkübatöre 10 dakika daha koyun.
- Santrifüj tüpünü inkübatörden çıkarın, pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüleyin.
- Süpernatanı santrifüjlenmiş tüpten aspire edin. Pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve sonra tüpe 1 mL kollajenaz ekleyip 5 dakikalığına inkübatöre koyun.
- İnkübatörden çıkarın ve pelletin bulanık olup olmadığını ve ayrı villus parçalarının görülüp görülmediğini görsel olarak doğrulayın. Pellet bulanık değilse 5 dakikalığına daha tekrar inkübatöre koyun.
- Kollajenaz etkisini durdurmak için santrifüj tüpüne 3 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyin.
- Tüpü 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüleyin.
- Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 mL vasat bırakın. Kurulum için kullanılan CHANG Amnio eklemeden önce pelleti süspansiyon haline getirin.

- Bir lamel içeren her petri tabağı için kültür başına 0,5 mL CHANG Amnio kullanarak optimum sayıda kültür oluşturun.
- Kültürleri ellemeden 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO₂ atmosferi altında inkübe edin.
- Kültürleri gün 2'de 1,5 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıya örtün.
4. günde kültürler üreme açısından kontrol edilmelidir. Üreme gözlenirse vasatı alın ve her lamela 2 mL yeni önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyin. Kültürler sonrasında 2 günde bir beslenmelidir. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
- Kültürleri gün 5'te üreme için kontrol edin ve yeterli koloni gözlenince toplayın. En iyi sonuçlar kültürlerin toplama öncesi günde CHANG Amnio ile beslenmesiyle alınır.

SAKLAMA VE STABİLİTE
-10°C altında dondurulmuş şekilde saklayın. Ürün dondurulmuş olarak saklandığında şişe etiketinde gösterilen sun kullanma tarihine kadar stabildir. Kullanılmamış ürün çalışma alikotlarına aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere tekrar dondurulabilir veya kapagı sıkıca kapatılıp 2°C - 8°C'de 30 güne kadar saklanabilir; en fazla iki kez dondurulabilir. Floresan ışıktan koruyun.

ÖNLEMLER VE UYARILAR

Bu cihazın, cihaz kullanımının amaçlanmış olduğu belirtilen uygulamanın dahil olduğu işlemler konusunda eğitimli personelce kullanılması amaçlanmıştır. Steril ambalajın olumsuz etkilendiği herhangi bir şişeyi kullanmayın. CHANG Amnio ürününü etikette belirtilen sun kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

SLOVENŠČINA

INDIKACIJE ZA UPORABO

Medij CHANG Amnio z gentamicinom in L-glutaminom se lahko uporablja za naslednje aplikacije:

- primarna kultura celic amnijske tekočine,
- gojene pasažirane celice amnijske tekočine,
- trdno amnijsko tkivo iz vzorcev horionskih resic.

Ta medij je zasnovan za uporabo v CO₂-inkubatorjih (kulture, uravnotežene v atmosferi s 5–8 % CO₂).

Končni pH mora biti 6,65–7,44. Glejte navodila za uporabo.

OPIS PRIPOMOČKA

CHANG Amnio je celovit medij, pripravljen za uporabo pri primarnih kulturah celic humane amnijske tekočine (AFC), vzorčenju horionskih resic (CVS) in koncepcijskih produktih (POC) za namene določanja kariotipa in drugih prenatalnih genskih testov. Medij je optimiziran za metodologije z bučkami in metodologije *in situ*. Ta izdelek vsebuje antibiotik gentamicinjev sulfat (50 µg/ml).

KOMPONENTE		
Pufri Natrijev bikarbonat	Beljakovine_hormoni in rastni faktorji Serum govejeja zarodka (FBS) Serum novorojenega teleta Humani transferin Fibroblastni rastni faktor (FGF) Inzulín Progesteron Testosteron Beta-estradíol Hidrokorízon	Magnezíjev sulfat Natrijev fosfat
Antioksidant Tiotična kislina	Nukleinske kisline Deoksiaadenozin Deoksicitidín Deoksiguanozín Adenozín Citidín Gvanzín Timidín Uridín	
Antibiotik Gentamicíníjev sulfat	Indikator vrednosti pH Glutamínska kislina Glutámín Glicín Histidín Izolevcín Levcín Lizín Metionín Fenilalanín Prolín Serín Treonín Triptofán Tirozín Valín	Drugo Etilní alkohol Tiroín
Aminokisljine Alanín Argínín Asparagín Asparagínska kislina Cisteín Glutamínska kislina Glutámín Glicín Histidín Izolevcín Levcín Lizín Metionín Fenilalanín Prolín Serín Treonín Triptofán Tirozín Valín	Vitamini in elementi v sledovih Askorbínska kislina Folna kislina Nikotinamid Riboflavin Tiamín Pantoténska kislina Kobalámín Piridoksin Biotín	
	Energijski substrati Glukoza Piruvat Inozítol	
	Soli in ioni Natrijev kloríd Natrijev selenít Kalcíjev kloríd Holínokloríd Kalcíjev kloríd Kalcíjev fosfat	Voda Kakovost, ki ustreza vodi za injekcije

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

STERILNOST

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

PRIPRAVA ZA UPORABO

Odtajanje izvedite na pultu pri sobni temperaturi, ali tako da steklenico namestite v vodno kopel pri 37 °C.

Medij CHANG Amnio vsebuje gentamicin (50 mg/l). Po želji lahko dodate še več antibiotikov.

ALIKVOTIRANJE MEDIJA CHANG Amnio

- Medij CHANG Amnio odtalite po zgornjih navodilih.
- Z aseptično tehniko ga porazdelite na alikvote primerne velikosti in ponovno zamrznite.
- Ko želite alikvote uporabiti, jih odtalite v vodni kopeli pri 37 °C.

NAVODILA ZA UPORABO

Uporaba medija CHANG Amnio za primarne kulture:

metodologije in situ

- Amnijsko tekočino 10 minut centrifugirajte pri približno 1.200 vrt./min, da koncentrirate celice.
- Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar ga pustite pribl. 0,5 ml nad celično usedlino (ali približno dvakratni volumen usedline) v centrifugirani amnijski tekočini. Po potrebi alikvotirajte supernatant (vsaj 1 ml, če je mogoče) za testiranje alifatetoproteina (AFP) in acetilholinesteraze. Če vzorec vsebuje kri, pripravite dodaten alikvot za nadaljnje testiranje. Ponovno suspendirajte celično usedlino v majhnem volumnu bolnične lastne amnijske tekočine. V koncentrirano celično suspenzijo dodajte dovolj medija CHANG Amnio, da dobite končni volumen za prevleko krvnih stekelc 0,5 ml na stekelce (skupaj 4 krvna stekelca, odvisno od velikosti celične usedline) ali 2 ml na stekleničko. Če prejmete vzorec bolnice v tretjem trimesečju nosečnosti, je celična usedlina lahko večja, vendar vsebuje manj živih celic; zato boste morali pripraviti gostejšo kulturo (z manj medija kot običajno).
- Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO₂ pri 37 °C.
2. dan kulture zalijte z 2 ml medija CHANG Amnio.
- Po 4 do 5 dneh preverite, ali kulture rastejo. Ko opazite rast, morate kulture nahraniti. Kulture nahranite tako, da odstranite vse supernatant kulture in ga nadomestite z 2 ml svežega medija CHANG Amnio. Priporočljivo je, da v nadaljevanju kulture nahranite vsaka 2 dni. Če vzorci vsebujejo kri, bo morda treba pogosteje zamenjati medij za gojenje kultur.
- Na 5. dan ali po 5. dnevu preverite, koliko so kulture zrastle, in jih spravite, ko opazite dovolj kolonij.
- Rezultat bo najboljši, če kulture nahranite z medijem CHANG Amnio en dan, preden jih spravite.

Uporaba medija CHANG Amnio za primarne kulture:

Metodologije z bučkami

- Amnijsko tekočino 10 minut centrifugirajte pri približno 1.200 vrt./min, da koncentrirate celice.
- Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar ga pustite pribl. 0,5 ml nad celično usedlino (ali približno dvakratni volumen usedline) v centrifugirani amnijski tekočini. Po potrebi alikvotirajte supernatant (vsaj 1 ml, če je mogoče) za testiranje alifatetoproteina (AFP) in acetilholinesteraze. Če vzorec vsebuje kri, pripravite dodaten alikvot za nadaljnje testiranje. Ponovno suspendirajte celično usedlino v majhnem volumnu bolnične lastne amnijske tekočine. Dodajte 4 ml medija CHANG Amnio, da dobite celotni volumen 5 ml na bučko. Če prejmete vzorec bolnice v tretjem trimesečju nosečnosti, je celična usedlina lahko večja, vendar vsebuje manj živih celic; zato boste morali pripraviti gostejšo kulturo (z manj medija kot običajno).
- Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO₂ pri 37 °C.
- Na 5. dan preverite rast. Medij zamenjajte z 2 ml svežega medija CHANG Amnio in spravite celice, če opazite zadostno rast.
- V nadaljevanju vsak dan preverite rast kultur in zamenjajte medij v celoti, dokler ne opazite, da je dovolj kolonij pripravljenih, da jih lahko spravite. Če vzorci vsebujejo kri, bo morda treba pogosteje zamenjati medij za gojenje kultur.
- Rezultat bo najboljši, če kulture nahranite z medijem CHANG Amnio en dan, preden jih spravite.

Uporaba medija CHANG Amnio za gojene pasažirane celice amnijske tekočine:

Če želite pasažirati celice, obdelajte kulture s tripsinom (ali pronazo itd.), kar bi običajno naredili pri celicah, gojenih v običajnem mediju. Vendar je treba obdelavo s proteazami skrbno spremljati. Celice amnijske tekočine, gojene v mediju CHANG Amnio, so običajno občutljivejše za obdelavo s proteazami kot celice, ki so gojene v običajnem mediju. Za upoštevanje tega boste morda morali spremeniti protokol.

Opomba: Vrednost pH medija, ki se uporablja za hranjenje kultur, mora biti med 6,65 in 7,44 (tj. kulturi mora biti rahlo rumenkaste barve lososa). Vrednost pH zlahka prilagodi tako, da medij za 30 minut postavite v inkubator s 5–8 % CO₂ (pokrovček naj bo nekoliko priprt).

Opomba: Ob odtajanju medija Chang Amnio se lahko izloči manjša količina oborin kalcijevega oksalata in beljakovin. Ni znano, da bi ti oborini vplivali na uporabnost izdelka.

Priprava vzorcev horionskih vilusov:

- Petrijevko označite za vsakega od vnesenih vzorcev, vsebino vzorcev pa prenesite na aseptični način. V posodo dodajte 5 ml vnapej ogretega popolnega medija CHANG Amnio, nato pa jih za 30 minut namestite v inkubator pri 35–39 °C, v okoliu s 5–8 % CO₂ da omogočite usedanje krvi.
- Vzorec očistite z disekcijskim mikroskopom, najprej pod 1,5-kratno, nato pa prilagajeno pribl. 3-kratno povečavo. Opomba: Potrebneга je pribl. 20–40 mg vzorca horionskih vilusov.
- Z dvema paroma sterilnih prijemalk odstranite krvne strdke in druge morebitne ostanke posteljice iz materiala vilusov, pri tem pa delajte v posodi ob opazovanju z disekcijskim mikroskopom. Material vilusov je svetle barve, tubularen in/ali grudast z vidnimi vejami in venami.
- Čiste viluse prenesite v drugo petrijevko, ki vsebuje vnapej ogret popoln medij CHANG Amnio. Izvedite končno čiščenje, pri tem pa s prijemalko primate vilus in ga nežno stresite. Opomba: Za uporabo pri posamezni kulturi je idealna količina 5 mg. Pazite, da občutljivih resic ne poškodujete.
- Viluse v medije prenesite v 15-ml epruveto za centrifugiranje, nato pa v epruveto za centrifugiranje dodajte 4 kapljice antibiotika (tj. gentamicinijevega sulfata, 50 µl/ml). Epruveto pustite pri miru 30 minut.
- 5 minut centrifugirajte resice pri 1.400 vrt./min.

Kultura vzorca horionskih vilusov:

- Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar pustite 0,5 ml medija nad celično usedlino (ali približno dvakratni volumen usedline).
- Usedlino nežno ponovno suspendirajte. Dodajte 2 ml vnapej ogretega medija CHANG Amnio v centrifugirno epruveto.
- Dodajte 2 ml tripsin EDTA in pustite kulturo, da se 10 minut nemoteno inkubira pri temperaturi 35–39 °C v atmosferi s 5–8 % CO₂. Vzemite epruveto iz inkubatorja, ponovno suspendirajte usedlino in jo postavite v inkubator za dodatnih 10 minut.
- Vzemite centrifugirno epruveto iz inkubatorja, ponovno suspendirajte usedlino in centrifugirajte 8–10 minut pri 1.400 vrt./min.
- Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete. Ponovno suspendirajte usedlino, nato v epruveto dodajte 1 ml kolagenaze in jo postavite v inkubator za 5 minut.
- Epruveto vzemite iz inkubatorja in vizualno preverite, ali je usedlina motna in ali ni videti ločenih posameznih kosov resic. Če usedlina ni motna, jo ponovno postavite v inkubator za nadaljnjih 5 minut.
- Dodajte 3 ml vnapej ogretega medija CHANG Amnio v centrifugirno epruveto, da ustavite delovanje kolagenaze.
- Epruveto centrifugirajte 8–10 minut pri 1.400 vrt./min.
- Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar pustite 0,5 ml medija nad celično usedlino. Ponovno suspendirajte usedlino, preden dodate medij CHANG Amnio, ki ste ga uporabili za pripravo.
- Pripravite optimalno število kultur z uporabo 0,5 ml medija CHANG Amnio na kulturo za vsako petrijevko, ki vključuje krvno stekelce.
- Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO₂ pri 35–39 °C.
2. dan kulture zalijte z 1,5 ml predhodno ogretega medija CHANG Amnio.

- Po 4 dneh preverite, ali kulture rastejo. Če opazite rast, odstranite medij in na vsako krvno stekelce dodajte 2 ml predhodno ogretega svežega medija CHANG Amnio. Potem morate kulture nahraniti vsaka 2 dni. Če vzorci vsebujejo kri, bo morda treba pogosteje zamenjati medij za gojenje kultur.
- Na 5. dan preverite, koliko so kulture zrastle, in jih spravite, ko opazite dovolj kolonij. Rezultat bo najboljši, če kulture nahranite z medijem CHANG Amnio en dan, preden jih spravite.

SHRANJEVANJE IN STABILNOST

Izdelek shranjujte zamrznjen pri temperaturi pod –10 °C. Če se shranjuje zamrznjen, je stabilen do datuma izteka uporabnosti, ki je naveden na nalepki steklenice. Neporabljen izdelek 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. Zamrzne se lahko največ dvakrat. Zaščite 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. Ne uporabite nobene steklenice, če je njena sterilna embalaža poškodovana. Medija CHANG Amnio ne smete uporabljati po izteku roka uporabnosti, navedenega na nalepki.

БЪЛГАРСКИ

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

CHANG Amnio с гентамицин и L-глутамин може да се използва за следните приложения:

1. Первична култура на клетки от амниотична течност,
2. растящи пасажни клетки от амниотична течност,
3. твърда амнионна тъкан от проба на хорионни въси.

Тази среда е предназначена за използване в CO₂ инкубатори (култури, еквилибрирани с 5% – 8% CO₂ атмосфера).

Окончателното pH ниво трябва да е 6,65 – 7,44. Моля, вижте указанията за употреба.

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

CHANG Amnio е пълна, готова за използване среда за първично култивиране на клетки от човешка амниотична течност (AFC), проби на хорионни въси (CVS) и продукти за зачеване (POC) за използване в кариотипизирани и в други пренатални генетични тестове. Тя е оптимизирана за методология със слайд-флакон и методология in situ. Този продукт съдържа антибиотик гентамицин сулфат (50 µg/ml).

КОМПОНЕНТИ			
Буфери Натриев бикарбонат	Протеини, хормони и растежни фактори Фетален говежди серум (FBS) Говежди серум на новородено Човешки трансферин Фибробластен растежен фактор (FGF) Инсулин Прогестерон Тестостерон Бета естрадиол Хидрокортизон	Магнезиев сулфат Натриев фосфат Нуклеинови киселини Дезоксиаденозин Дезоксицитидин Дезоксигуанозин Аденозин Цитидин Гуанозин Тимидин Уридин	
Антиоксидант Тиоктова киселина			
Антибиотици Гентамицин сулфат		Други Етилов алкохол Тиронин	
Аминокиселини Аланин Аргинин Аспарагин Аспаргинова киселина Цистеин Глутаминова киселина Глутамин Глицин Хистидин Изолевцин Левцин Лизин Метонин Фенилаланин Пролин Серин Треонин Триптофан Тирозин Валин	rH индикатори Фенол, червен Енергийни субстрати Глюкоза Пируват Инозитол Соли и йони Натриев хлорид Натриев селенит Калиев хлорид Холин хлорид Калиев хлорид Калиев фосфат	Витамини и микроелементи Аскорбинова киселина Фолиева киселина Никотинамид Рибофлавин Тиамин Пантотенова киселина Кобаламин Пиридоксин Биотин Вода Качество – вода за инжектиране	

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

СТЕРИЛНОСТ

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

ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА

Размразете върху стерилна поставка на стайна температура или като поставите бутилка на водна баня при 37° C.

CHANG Amnio съдържа гентамицин (50 mg/l). По желание могат да бъдат добавени допълнителни антибиотици.

АЛИКВОТИРАНЕ НА CHANG Amnio

1. Размразете CHANG Amnio съгласно инструкции по-горе.
2. Разпределете асептично в аликвотни части с подходящ обем и замразете отново.
3. Размразете аликвотните части във водна баня с температура 37° C, когато е необходимо да се използва.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Използване на CHANG Amnio за първични култури: методологии *in situ*

1. Центрофугируйте амниотичната течност при приблизително 1200 rpm за 10 минути, за да концентрирате клетките.
2. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки приблизително 0,5 ml над пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата) центрофугирана амниотична течност. Разделете на аликвотни части супернатанта (поне 1 ml, ако е възможно) за анализи на алфа-фетопротеин (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесименът съдържа кръв, пригответе допълнителна аликвотна част за последващо тестване. Ресуспендирайте пелетата от клетки в малък обем амниотична течност от самия пациент. Добавете достатъчно CHANG Amnio към концентрираната суспензия на клетки, за да остане окончателен обем за нанасяне от 0,5 ml на покривно стъкло (общо 4 покривни стъкла в зависимост от размера на пелетата от клетки), или 2 ml на слайд-флакон. Ако спесименът е получен от пациента в третия триместър на бременността, пелетата може да е по-голяма, но да съдържа по-малко жизнени клетки, което ще изисква по-сериозно засаждане (по-малко среда от нормалното).
3. Инкубирайте културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера.
4. В ден 2 залейте културите, като добавите 2 ml CHANG Amnio.
5. След 4 до 5 дни културите трябва да бъдат проверени за растеж. След като бъде установен растеж, културите трябва да се запазват. Хранете културите, като отстранявате целия супернатант на културата и го заменяете с 2 ml прясна CHANG Amnio. Препоръчва се културите да се запазват на всеки 2 дни след това. За спесимени с кръв културите може да изискват по-честа смяна на средата.
6. Проверете културите за растеж във или след ден 5 и съберете, когато се наблюдават достатъчно колонии.
7. Най-добри резултати се постигат, когато културите се запазват с CHANG Amnio в деня преди събирането.

Използване на CHANG Amnio за първични култури: Методологии със слайд-флакон

1. Центрофугируйте амниотичната течност при приблизително 1200 rpm за 10 минути, за да концентрирате клетките.
2. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки приблизително 0,5 ml над пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата) центрофугирана амниотична течност. Разделете на аликвотни части супернатанта (поне 1 ml, ако е възможно) за анализи на алфа-фетопротеин (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесименът съдържа кръв, пригответе допълнителна аликвотна част за последващо тестване. Ресуспендирайте пелетата от клетки в малък обем амниотична течност от самия пациент. Добавете 4 ml CHANG Amnio за общ обем от 5 ml на слайд-флакон. Ако спесименът е получен от пациента в третия триместър на бременността, пелетата може да е по-голяма, но да съдържа по-малко жизнени клетки, което ще изисква по-сериозно засаждане (по-малко среда от нормалното).

3. Инкубирайте културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера.
4. Проверете за растеж в ден 5. Сменете средата с 2 ml прясна CHANG Amnio и съберете, ако се наблюдава достатъчен растеж на клетките.
5. Проверявайте културите за растеж и сменяйте изцяло средата всеки ден след това, докато се установят достатъчно колонии и са готови за събиране. За спесимени с кръв културите може да изискват по-честа смяна на средата.
6. Най-добри резултати се постигат, когато културите се запазват с CHANG Amnio в деня преди събирането.

Използване на CHANG Amnio за растеж на пасажни клетки от амниотична течност:

За пасаж на клетките третирайте културите с трипсин (или проназа и др.), както обикновено бихте направили, когато клетките растат в конвенционална среда. Тритирането с протеаза обаче трябва да се наблюдава внимателно. Клетките от амниотична течност, растящи в CHANG Amnio, показват тенденция към повишена чувствителност при третиране с протеаза от клетките, растящи в конвенционална среда. Може да е необходимо да модифицирате своя протокол, за да вземете това предвид.

Забележка: Нивото на pH на средата, използвана за храняване на културите, трябва да е между 6,65 и 7,44 (т.е. средата трябва да е с леко жълтеникав розово-оранжев цвят). Нивото на pH може лесно да се регулира чрез поставяне на средата в 5% – 8% CO₂ инкубатор с леко разхлабена капачка за около 30 минути.

Забележка: При размразяване Chang Amnio може да се образува известно количество калциев оксалат и протеинови преципитати. Няма данни тези протеинови преципитати да влияят върху ефективността на продукта.

Подготовка на проба на хорионни въси:

1. Обозначете с етикет петриеве блюдо за всеки получен спесимен и прехвърлете асептично съдържанието на пробата. Добавете 5 ml от предварително затоплена завършена среда CHANG Amnio в блюдото и поставете в инкубатор за 30 минути при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера, за да може кръвта да се утаи.
2. Почистете спесимена с помощта на стереомикроскоп, първоначално с оптично увеличение 1,5 X пъти, след което го регулирайте до около 3 X пъти. Забележка: Необходимо е са приблизително 20 – 40 mg от проба на хорионни въси.
3. С помощта на две стерилни пинцети отстранете кръвните съсиреси и всякакъв материал от маточна лигавица от материала от въси, докато работите в блюдото под стереомикроскопа. Материалът от въси е със светъл цвят, трябва да и/или на булки, с видими разклонения и вени.
4. Прехвърлете чистите въси в друго петриеве блюдо с предварително затоплена завършена среда CHANG Amnio. Извършете окончателно почистване, като използвате щипци, за да хванете въсите и леко разбъркайте. Забележка: Идеалното количество за използване е 5 mg на култура. Внимавайте да не увредите крехките въси.
5. Прехвърлете въсите и средата в центрофужна епруветка от 15 ml и добавете 4 капки антибиотик (т.е. Гентамицин сулфат, 50 µl/ml) към епруветката. Оставете да престои за 30 минути.
6. Центрофугируйте въсите при приблизително 1400 rpm за 5 минути.

Култура от проба на хорионни въси:

1. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, като се уверите, че сте оставили 0,5 ml среда над пелетата от клетки (или около 2 X обема на пелетата).
2. Внимателно ресуспендирайте пелетата. Добавете 2 ml предварително затоплена среда CHANG Amnio към центрофужната епруветка.

3. Добавете 2 ml трипсин-ЕДТА и инкубирайте културата в покой при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера за 10 минути. Отстранете епруветката от инкубатора, ресуспендирайте пелетата и поставете в инкубатор за още 10 минути.
4. Отстранете центрофужната епруветка от инкубатора, ресуспендирайте пелетата и центрофугируйте за 8 – 10 минути при 1400 rpm.
5. Аспирирайте супернатанта от центрофужната епруветка. Ресуспендирайте пелетата, след това добавете 1 ml колагеназа към епруветката и поставете в инкубатор за 5 минути.
6. Отстранете от инкубатора и визуално проверете дали пелетата е мътна и не могат да се видят отделни части от отделните въси. Ако пелетата не е мътна, поставете я отново в инкубатора за още 5 минути.
7. Добавете 3 ml предварително затоплена CHANG Amnio към центрофужната епруветка, за да спрете действието на колагеназата.
8. Центрофугируйте епруветката за 8 – 10 минути при 1400 rpm.
9. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки 0,5 ml среда над пелетата от клетки. Ресуспендирайте пелетата преди добавяне на CHANG Amnio, използвана за приготвяне.
10. Пригответе оптимален брой култури, като използвате 0,5 ml CHANG Amnio на култура, за всяко петриеве блюдо с покривно стъкло.
11. Инкубирайте културите в покой при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера.
12. В ден 2 залейте културите, като добавите 1,5 ml предварително затоплена CHANG Amnio.
13. На 4 дни културите трябва да се проверяват за растеж. Ако се наблюдава растеж, отстранете среда и добавете 2 ml прясна, предварително затоплена CHANG Amnio към всяко покривно стъкло. Културите трябва да се хранят на всеки 2 дни след това. За спесимени с кръв културите може да изискват по-честа смяна на средата.
14. Проверете културите за растеж в ден 5 и съберете, когато се наблюдават достатъчно колонии. Най-добри резултати се постигат, когато културите се запазват с CHANG Amnio в деня преди събирането.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

Съхранявайте замразена при температура под -10° C. Продуктът е стабилен до изтичане на срока на годност, посочен върху етикета на бутилката, когато се съхранява замразен. Неизползваният продукт може да бъде разпределен в работни аликвотни части и замразен отново за употреба на по-късен етап или да бъде плътно затворен с капачка и съхранен при температура от 2° C до 8° C за до 30 дни. Той може да бъде замразяван максимум два пъти. 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. Не използвайте бутилка, чиято стерилна опаковка е нарушена. Не използвайте CHANG Amnio след изтичане на срока на годност, посочен на етикета.

SLOVENČINA

INDIKÁCIA NA POUŽITIE

CHANG Amnio s gentamicínom a L-glutamínom možno použiť na nasledujúce aplikácie:

1. primárnu kultiváciu buniek plodovej vody
2. rast pasážovaných buniek plodovej vody
3. vzorkovanie pevného zárodočného tkaniva z choriových klkov.

Toto médium bolo navrhnuté na použitie v inkubátoroch CO₂ (kultúrach ustálených s atmosférou 5 % – 8 % CO₂).

Výsledné pH musí byť 6,65 – 7,44. Pozrite si návod na použitie.

POPIS ZARIADENIA

CHANG Amnio je kompletné médium určené na priame použitie pri primárnej kultivácii buniek plodovej vody (AFC), odbere vzoriek choriových klkov (CVS) a produktov na počatie (POC) na použitie pri karyotypovaní a iných prenatálnych genetických testoch. Je optimalizovaný pre metódy fliašek aj in situ. Tento produkt obsahuje antibiotikum gentamicínsulfát (50 µg/ml).

ZLOŽKY		
<u>Pufre</u> hydrogenuhličitán sodný	<u>Bielkoviny, hormóny</u> <u>a rastové faktory</u> fetálne bovinné sérum (FBS) neonátálne bovinné sérum ľudský transferín fibroblastový rastový faktor (FGF) inzulín progesterón testosterón beta estradiol hydrokortizón	síran horečnatý fosfát sodný
<u>Antioxidant</u> kyselina tioktová	<u>Nukleové kyseliny</u> deoxyadenozín deoxycytidín deoxyguanozín adenozín cytidín guanozín tymidín uridín	
<u>Antibiotikum</u> gentamicínsulfát		
<u>Aminokyseliny</u> alanín arginín asparagín kyselina asparagová cystein kyselina glutámová glutamin glycín histidín izoleucín leucín lyzín metionín fenylalanín prolín serín treonín tryptofán tyrozín valín	<u>Indikátor pH</u> fenolová červená	<u>Ľná</u> etylalkohol tyronín
	<u>Energetické</u> <u>substancie</u> glukóza nikotínamid riboflavín tiamin kyselina pantoténová kobalamín pyridoxín biotín	
	<u>Soli a ióny</u> chlorid sodný seleničitan sodný chlorid vápenatý cholin vápenatý cholin draselný fosforečnan draselný	<u>Voda</u> kvalita vody na injekciu

KONTROLA KVALITY

STERILITA

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

PRÍPRAVA NA POUŽITIE

Rozmrazte na sterilnom pulte pri izbovej teplote alebo vložením fľaše do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C.

CHANG Amnio obsahuje gentamicínsulfát (50 mg/l). Ak chcete, možno pridať ďalšie antibiotiká.

ALKVOTOVANIE CHANG Amnio

1. CHANG Amnio rozmrazte podľa pokynov vyššie.
2. Asepticky ho distribuujte do alikvót vhodnej veľkosti a znovu zmrazte.
3. Alikvóty rozmrazte vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C, keď sú pripravené na použitie.

NÁVOD NA POUŽITIE

CHANG Amnio použite na primárne kultúry: metódy *in situ*

1. Plodový vodu odstreďujte pri približne 1 200 otáčok za minútu 10 minút, aby sa koncentrovali bunky.
2. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte približne 0,5 ml nad bunkovou peletou (alebo 2x objem pelety) odstredenej plodovej vody. Podľa potreby alikvotujte supernatant (najmenej 1 ml, ak je to možné), na analýzu alfaletoproteínu (AFP) a acetylcholinesterázy. Ak je vzorka krvavá, pripravte ďalšiu alikvótu na ďalšie testovanie. Bunkovú peletu resuspendujte v malom objeme plodovej vody pacientky. Pridajte dostatočné množstvo CHANG Amnio do koncentrovanej bunkovej suspenzie, aby sa vytvoril konečný plátovací objem 0,5 ml na každé krycie skličko (celkom 4 krycie sklička, podľa veľkosti bunkovej pelety) alebo 2 ml na každú fliaštičku. Ak sa vzorka získa od pacientky v treťom trimestri tehotenstva, peleta môže byť väčšia, no obsahovať menej životaschopné bunky a preto vyžadovať hustejšiu kultúru (menej média, než normálne).
3. Nerušené kultúry inkubujte pri teplote 37 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO₂.
4. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 2 ml CHANG Amnio.
5. Po 4 až 5 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Kultúry treba pririviť, keď sa pozoruje rast. Kultúry pririvte odstránením všetkého supernatantu kultúry a pridaním 2 ml čerstvého CHANG Amnio. Potom sa odporúča kultúry pririviť každé 2 dni. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
6. Rast na kultúrach skontrolujte okolo 5. dňa a vykonajte zber, keď spozorujete dostatočné kolónie.
7. Najlepšie výsledky sa dosiahnú, keď sú kultúry pririvené CHANG Amnio deň pred zberom.

CHANG Amnio použite na primárne kultúry: Metódy fliaštičiek

1. Plodový vodu odstreďujte pri približne 1 200 otáčok za minútu 10 minút, aby sa koncentrovali bunky.
2. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte približne 0,5 ml nad bunkovou peletou (alebo 2x objem pelety) odstredenej plodovej vody. Podľa potreby alikvotujte supernatant (najmenej 1 ml, ak je to možné), na analýzu alfaletoproteínu (AFP) a acetylcholinesterázy. Ak je vzorka krvavá, pripravte ďalšiu alikvótu na ďalšie testovanie. Bunkovú peletu resuspendujte v malom objeme plodovej vody pacientky. Pridajte 4 ml CHANG Amnio na konečný objem 5 ml na fliaštičku. Ak sa vzorka získa od pacientky v treťom trimestri tehotenstva, peleta môže byť väčšia, no obsahovať menej životaschopné bunky a preto vyžadovať hustejšiu kultúru (menej média, než normálne).
3. Nerušené kultúry inkubujte pri teplote 37 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO₂.
4. Skontrolujte rast na 5. deň. Ak pozorujete dostatočný rast buniek, vymeňte médium za 2 ml čerstvého CHANG Amnio a vykonajte zber.
5. Skontrolujte rast na kultúrach a potom kompletne vymieňajte médium každý deň dovtedy, kým nepozorujete dostatočné kolónie a nie sú pripravené na zber. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
6. Najlepšie výsledky sa dosiahnú, keď sú kultúry pririvené CHANG Amnio deň pred zberom.

Použite CHANG Amnio na rast pasážovaných buniek plodovej vody:

Na pasážovanie buniek ošetrte kultúry trypsinom (alebo pronázou atď.) ako obvykle, keď sa bunky pestujú v konvenčnom médiu. Oštenie pronázou však treba pozorne sledovať. Bunky plodovej vody vypestované v CHANG Amnio sú výzajne citlivejšie na oštenie pronázou, než keď sú vycitované v konvenčnom médiu. Preto môže byť potrebné upraviť váš protokol a vziať to do úvahy.

Poznámka: pH média použitého na živenie kultúr musí byť medzi 6,65 – 7,44 (t. j. médium musí mať mierne žlté-lososovú farbu). pH možno jednoducho upraviť vloženíím média do inkubátora s 5 % – 8 % CO₂ s mierne uvoľneným vrchnákom na asi 30 minút.

Poznámka: Po rozmrazení sa v Chang Amnio môžu vytvoriť zrazeniny oxalátu vápenatého a bielkovín. O týchto zrazeninách nie je známe, že by mali vplyv na výkon produktu.

Príprava vzorky z choriových klkov:

1. Označte Petriho misku pre každú prijatú vzorku a obsah vzorky asepticky preneste. 5 ml zahriateho kompletného média CHANG Amnio dajte do misky a vložte do inkubátora na 30 minút pri teplote 35 °C – 39 °C, v atmosfére 5 – 8 % CO₂, aby sa krv mohla usadiť.
2. Vzorku očistite pomocou disekčného mikroskopu, najprv pod zväčšením 1,5x, potom zväčšenie uprave na 3 x. Poznámka: Potrebná je vzorka s približne 20 – 40 choriových klkov.
3. Pomocou dvoch párov sterilných klieští odstráňte z klkového materiálu krvné zrazeniny a všetku materskú deciduu, kým pracujete v miske, pod disekčným mikroskopom. Klkový materiál je svetlej farby, valcovitý a/alebo hrčovitý s viditeľnými vetvami a žilami.
4. Čisté krky preneste do ďalšej Petriho misky obsahujúcej zahriate kompletné médium CHANG Amnio. Vykonajte záverečné čistenie, kliešťami uchopte kľky a jemne nimi hýbte. Poznámka: Ideálne množstvo na použitie na jednu kultúru je 5 mg. Dajte pozor, aby ste nepoškodili krehké kľky.
5. Preneste kľky a médium do 15 ml skúmavky na odstreďovanie a pridajte 4 kvapky antibiotika (t. j. gentamicínsulfát, 50 µl/ml) do skúmavky na odstreďovanie. Nechajte postáť 30 minút.
6. Kľky odstreďujte pri 1 400 otáčok za minútu 5 minút.

Kultivácia vzorky z choriových klkov:

1. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovou peletou (alebo 2X objem pelety).
2. Peletu jemne resuspendujte. Do skúmavky na odstreďovanie pridajte 2 ml zahriateho média CHANG Amnio.
3. Pridajte 2 ml trypsinu EDTA a nerušené kultúry inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO₂, 10 minút. Skúmavku vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a vložte ju do inkubátora na ďalších 10 minút.
4. Skúmavku na odstreďovanie vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a odstreďte ju 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
5. Z odstredenej skúmavky aspirujte supernatant. Peletu resuspendujte, potom do skúmavky pridajte 1 ml kolagenázy a vložte ju do inkubátora na 5 minút.
6. Vyberte z inkubátora a zrakom skontrolujte, či peleta nie je zakalená a či nie je vidieť zjavné kusy jednotlivých klkov. Ak peleta nie je zakalená, vložte ju naspäť do inkubátora na ešte 5 minút.
7. Pridajte 3 ml zahriateho roztoku CHANG Amnio do skúmavky na odstreďovanie, aby sa zastavilo pôsobenie kolagenázy.
8. Skúmavku odstreďujte 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
9. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovou peletou. Peletu resuspendujte skôr, než pridáte CHANG Amnio použité na prípravu.
10. Pripravte optimálny počet kultúr s použitím 0,5 ml CHANG Amnio na jednu kultúru na každú Petriho misku, ktorá obsahuje krycie skličko.
11. Nerušené kultúry inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO₂.
12. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 1,5 ml zahriateho roztoku CHANG Amnio.
13. Po 4 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Ak pozorujete rast, odstráňte médium a pridajte 2 ml čerstvého zahriateho roztoku CHANG Amnio na každé krycie skličko. Potom sa majú kultúry pririviť každé 2 dni. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
14. Rast na kultúrach skontrolujte okolo 5. dňa a vykonajte zber, keď spozorujete dostatočné kolónie. Najlepšie výsledky sa dosiahnú, keď sú kultúry pririvené CHANG Amnio deň pred zberom.

UCHOVÁVANIE A STABILITA

Uchovávať zmrazené pri teplote pod -10 °C. Produkt bude stabilný až do dátumu expirácie na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazený. Nepoužitý produkt možno nadávkoovať do pracovných alikvót a znovu zmraziť na neskoršie použitie, alebo tesne nasadiť vrchnák a uchovávať pri teplote 2 °C až 8 °C do 30 dní; možno ho zmraziť maximálne dvakrát. Chráňte pred fluorescenčným svetlom.

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA

Toto zariadenie je určené na použitie personálom vyškoleným na procedúry, ktoré zahŕňajú aplikáciu, na ktorú je toto zariadenie určené. Nepoužívajte žiadnu fľašu, ktorej sterilný obal bol narušený.

CHANG Amnio nepoužívajte po dátume expirácie uvedenom na označení.