IrvineScientific

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 diagnostisleeks kasutamiseks.

In vitro diagnosztikai alkalmazáshoz.

Skirta *in vitro* diagnostikai.

In vitro diagnostik kullanım için.

Na diagnostické použitie *in vitro*.

За *in vitro* диагностична употреба.

Za uporabo u *in vitro* diagnostici.

Ghal użu dijanjostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Glossary of Symbols*:

REF — Catalog Number

LOT — Lot Number

STERILE A — Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)

Expiration: Year - Month - Day

Caution, consult accompanying documents

Consult instructions for use

−10°C — Storage Temperature store below -10°C

STERIDOS 2 — Do Not Re-Sterilize

Do not use if package is damaged

Manufacturer

CE Mark

Emergo Europe - Westervoortsedijk 60 6827 AT Arnhem The Netherlands

EC REP

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

Irvine Scientific, LLC
1830 E. Warner Ave., Santa Ana, California 92705 USA.
Telephone: 1 949 261 7800 • 1 800 437 5706 • Fax: 1 949 261 6522 • www.irvinesci.com

PN 40965 Rev.07
Effective Date: 27-FEB-2025

ENGLISH

INDICATION FOR USE
CHANG Amnio with Gentamicin and L-Glutamine may be used for the following applications:
1. the primary culture of amniotic fluid cells
2. growing passaged amniotic fluid cells
3. solid amnion tissue from chorionic villi sampling.

This medium has been designed for use in CO_2 incubators (cultures equilibrated with 5%-8% CO_2 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 virology or genetic testing. It has been optimized for both flask and in situ methodologies. This product contains the antibiotic Gentamicin Sulfate (50 µg/mL).

COMPONENTS

Buffers	Proteins, Hormones, and Growth Factors	Magnesium sulfate
Sodium bicarbonate	Fetal bovine serum (FBS)	Sodium phosphate
Antioxidant	Newborn bovine serum	Nucleic acids
Thiotic acid	Human transferrin	Deoxyadenosine
Antibiotic	Fibroblast growth factor (FGF)	Deoxycytidine
Gentamicin Sulfate	Insulin	Deoxyguanosine
Amino Acid	Progesterone	Deoxythymidine
Alanine	Testosterone	Cytidine
Arginine	Beta estradiol	Guanosine
Asparagine	Hydrocortisone	Thymidine
Aspartic Acid		Uridine
Cysteine	pH Indicator	
Glutamic Acid	Phenol red	Other
Glutamine		Ethyl alcohol
Glycine	Energy Substrates	Thyronine
Histidine	Glucose	
Isoleucine	Pyruvate	Vitamins and trace elements
Leucine	Inositol	Ascorbic acid
Lysine		Folic acid
Methionine	Salts & Ions	Nicotinamide
Phenylalanine	Sodium chloride	Riboflavin
Proline	Sodium selenite	Thiamine
Serine	Calcium chloride	Pantothenic acid
Threonine	Choline chloride	Cobalamin
Tryptophan	Potassium chloride	Pyridoxine
Tyrosine	Potassium phosphate	Biotin
Valine		
		Water
		WFI Quality

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. Finished product is also 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.

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

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

1. Centrifuge amniotic fluid at approx. 1,200 rpm for 10 minutes to concentrate the cells.
2. 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).
3. Incubate cultures undisturbed at 37°C 5-8% CO_2 atmosphere.
4. Flood cultures on day 2 by adding 2 mL of CHANG Amnio.
5. 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.
6. Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

Use of CHANG Amnio for Primary Cultures: Flask Methodologies

1. Centrifuge amniotic fluid at approx. 1,200 rpm for 10 minutes to concentrate the cells.
2. 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).
3. Incubate cultures undisturbed at 37°C, 5%-8% CO_2 atmosphere.
4. Check for growth on day 5. Change medium with 2 mL of fresh CHANG Amnio and harvest if sufficient cell growth is observed.
5. 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.
6. 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 protease, 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% CO_2 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:
1. 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% CO_2 atmosphere, to allow the blood to settle.
2. 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.
3. Pick up 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 branched with visible branches and veins.
4. 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.
5. 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.
6. Centrifuge villi at approx. 1,400 rpm for 5 minutes.

Chorionic Villi Sample Culture:
1. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, making sure to leave 0.5 mL of media above cell pellet (or about 2X volume of pellet).
2. Gently resuspend pellet. Add 2 mL of prewarmed CHANG Amnio media to centrifuge tube.
3. Add 2 mL of Trypsin EDTA and incubate culture undisturbed at 35 - 39°C, 5 - 8% CO_2 atmosphere for 10 minutes. Remove tube from incubator, resuspend pellet and place in incubator for 10 additional minutes.
4. Remove centrifuge tube from incubator, resuspend pellet and centrifuge for 8 -10 minutes at 1,400 rpm.
5. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, Resuspend pellet, then add 1 mL of collagenase to tube and place in incubator for 5 minutes.
6. 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.
7. Add 3 mL of prewarmed CHANG Amnio to centrifuge tube to stop the action of the collagenase.
8. Centrifuge tube for 8- 10 minutes at 1,400 rpm.
9. 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.
10. Set up optimal number of cultures using 0.5 mL of CHANG Amnio per culture for each petri dish that contains a coverslip.
11. Incubate cultures undisturbed at 35 - 39°C, 5 - 8% CO_2 atmosphere.
12. Flood cultures on day 2 by adding 1.5 mL of prewarmed CHANG Amnio.
13. 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.
14. 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.

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 CO_2-Inkubatoren entwickelt (Kulturen, die mit 5-8% CO_2 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 Wachstumsfaktoren	Natriumphosphat
Natriumbicarbonat	Fetales Kälberserum (FBS)	Nukleinsäuren
Antioxidans	Serum von neugeborenen	Desoxyadenosin
Thiotansäure	Rindern	Desoxycytidin
Antibiotikum	Humanes Transferrin	Desoxyguanosin
Gentamicinsulfat	Fibroblasten-wachstumsfaktor	Adenosin
Aminosäure	Insulin	Cytidin
Alanin	Progesteron	Guanosin
Arginin	Testosteron	Thymidin
Asparagin	Beta-Estradiol	Uridin
Asparaginsäure	Hydrokortison	Andere
Cystein		Ethylalkohol
Glutaminsäure	pH-Indikator	Thyronin
Glutamin	Phenolrot	
Glycin		Vitamine und Spurenelemente
Histidin	Energiesubstrate	Ascorbinsäure
Isoleucin	Glukose	Folsäure
Leucin	Pyruvat	Nikotinamid
Lysin	Inositol	Riboflavin
Methionin		Thiamin
Phenylalanin	Salze und Ionen	Pantothensäure
Prolin	Natriumchlorid	Cobalamin
Serin	Natriumselenit	Pyridoxin
Threonin	Calciumchlorid	Biotin
Tryptophan	Cholinchlorid	
Tyrosin	Kaliumchlorid	Wasser
Valin	Natriumsulfat	Wasser für Injektionszwecke (WFI)
	Natriumphosphat	

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 Auftauen 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.

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

GEBRAUCHSANWEISUNG
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. 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 CO_2-Atmosphäre inkubieren.
4. Am 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 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 CO_2-Atmosphäre inkubieren.
4. Am 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 Primärkulturen: In situ-Methoden

Um die Zellen zu passagieren, die Kulturen mit Trypsin (oder Protease 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 CO_2-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 dahin übertragen. Der Petrischale 5 ml vorgewärmtes CHANG Amnio-Kompettmedium zusetzen und 30 Minuten lang bei 35–39 °C in einer 5–8%igen CO_2-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. Mit der Pinzette unter dem Präpariermikroskop mit zwei sterilen Pinzetten Blutgerinnsel und eventuell vorhandene mütterliche Decidua vom Zottenmaterial entfernen. Zottenmaterial ist hell gefärbt, schlauchförmig und/oder verzweigt 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. Das Ganze 30 Minuten lang stehen.
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 CO_2-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 CO_2-Atmosphäre inkubieren.
12. Die Kulturen am Tag 2 durch Zugabe von 1,5 ml vorgewärmtem CHANG Amnio überspülen.
13. Nach 4 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.
14. Kulturen am Tag 5 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.

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 CO_2-Atmosphäre inkubieren.
4. Am 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.

PREPARATION D'ALIQUOTES DE CHANG Amnio
1. Décongeler CHANG Amnio en suivant les instructions ci-dessus.
2. Répartir stérilement en plusieurs aliquotes de taille appropriée et recongeler.
3. 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*
1. Centrifuger le liquide amniotique à environ 1 200 t/min pendant 10 minutes pour concentrer les cellules.
2. 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).
3. Incuber les cultures sans agitation à 37 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO_2.
4. Inonder les cultures le deuxième jour en ajoutant 2 ml de CHANG Amnio.
5. 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.
6. Vérifier la croissance des cultures à partir du cinquième jour et procéder à la collecte lorsque les cultures ont des colonies de taille suffisante.
7. 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
1. Centrifuger le liquide amniotique à environ 1 200 t/min pendant 10 minutes pour concentrer les cellules.
2. 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).
3. Incuber les cultures sans agitation à 37 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO_2.
4. 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.
5. 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.
6. 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 trypsine (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). La pH peut facilement être ajusté en plaçant le milieu dans un incubateur contenant entre 5 et 8 % de CO_2 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 :
1. 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 CO_2 pour laisser le sang se déposer.
2. 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.
3. À l'aide de deux pares de pinces stériles, retirer les caillots sanguins et toute caduque maternelle du matériel villeux tout en travaillant dans la boîte sous le microscope de dissection. Le matériau de villosité est de couleur claire, tubulaire et/ou grumeleux avec des branches et des veines visibles.
4. 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.
5. 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.
6. Centrifuger les villosités à environ 1 400 t/min pendant 5 minutes.

Culture des échantillons de villosités choriales :
1. 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).
2. Remettre délicatement le culot en suspension. Ajouter 2 ml de milieu de CHANG Amnio préchauffé au tube à centrifuger.
3. Ajouter 2 ml de trypsine EDTA et incuber la culture sans agitation entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO_2 pendant 10 minutes. Sortir le tube de l'étuve, remettre le culot en suspension et le placer dans l'étuve pendant 10 minutes supplémentaires.
4. Sortir le tube à centrifuger de l'incubateur, remettre le culot en suspension et centrifuger pendant 8 à 10 minutes à 1 400 t/min.
5. 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.
6. 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.
7. Ajouter 3 ml de CHANG Amnio préchauffé au tube à centrifuger pour arrêter l'action de la collagénase.
8. Centrifuger le tube pendant 8 à 10 minutes à 1 400 t/min.
9. 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.
10. Préparer un nombre optimal de cultures avec 0,5 ml de CHANG Amnio par culture pour chaque boîte de Petri contenant une lamelle.
11. Incuber les cultures sans agitation entre 35 et 39 °C dans une atmosphère contenant entre 5 et 8 % de CO_2.
12. Inonder les cultures le jour 2 en ajoutant 1,5 ml de CHANG Amnio préchauffé.
13. 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.
14. 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 disp

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Pożywka CHANG Amnio z gentamycyną i L-glutaminą może być stosowana w przypadku:

1. hodowli pierwotnej komórek płynu owodniowego,
2. wzrostu pasażowanych komórek płynu owodniowego,
3. litej tkanki owodniowej z biopsji kosmków kosmówki.

Tę pożywkę zaprojektowano do użytku w inkubatorach z atmosferą CO_2 (hodowle doprowadzone do równowagi w atmosferze 5%–8% CO_2).

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), komórek kosmków kosmówki (CVS) i 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

OSAD

Pulpvid
Naatriumvesinikkarbonaat
Antioksüdant
Tiyoatsk ait
Antibiootik
Siarczan gentamütsiin
Aminohapped
Alanine
Arginine
Asparagiin
Asparagiinhape
Tsüsteiin
Glutamiinhape
Glutamiin
Glütsiin
Histidiin
Isoleutsiin
Leutsiin
Lisiin
Metioniin
Fenüülalaniin
Prolüin
Seriin
Treoniin
Trüptofaan
Türosiin
Valiin
Vitamiinid
Choline chloride
Folic acid
Niacinamide
Pantothenate
Pyridoxine
Riboflavin
Thiamine
Vitamin A
Vitamin B12
Vitamin C
Vitamin D2
Vitamin E
Süsinikhydraadid
Glükoos
Pürüvaat
Inositol
Soolad ja joonid
Naatriumkloriid
Naatriumselenit
Kaltsiumkloriid
Kaliumkloriid
Kaaliumfosfaat
Magneesiumsulfaat
Naatriumfosfaat
Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid
Veiseloote jäärdu seerum (FBS)
Vastsüündinud veise pärituolu seerum
Inimese transferriin
Fibroplastide kasvufaktor (FGF)
Insuliin
Progesteroon
Testosteroon
Beeta-östradiool
Hüdrokortisoon
pH-indikaator
Fenoolpunane
Energia substraadid
Glükoos
Pürüvaat
Inositool
Soolad ja joonid
Naatriumkloriid
Naatriumselenit
Kaltsiumkloriid
Kaliumkloriid
Kaaliumfosfaat
Magneesiumsulfaat
Naatriumfosfaat
Nukleiinhapped
Deoksüadenosiin
Deoksüsitidiin
Deoksüguanosiin
Adenosiin
Tsütidiin
Guanosiin
Tümidiin
Uridiin
Muu
Etüülalkohol
Türoniin

KASUTUSJUHEND

CHANG Amnio kasutamine primaarkultuuride puhul: *in situ* metodoloogiad

Koorioni huntude proovi ettevalmistamine

1. Märkige iga saadud proovi kohta Petri tass ja viige proovi sisu üle aseptiliselt. Lisage tassi 5 ml eelsoojendatud CHANG Amnio valmissöödet ning asetage see 30 minutiks inkubaatorisse 35–39 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris, et lasta verel setitada.
2. Puhastage proov stereomikroskoobi abil, kasutades osiaalgu 1,5-kordset ning seejärel 3-kordset suurendust. Märkus. Vajalik on umbes 20–40 mg koorioni huntude proovi.
3. Eemaldage stereomikroskoobi all huttude seast kahe paari sirelisteele pintsettide abil vereklombid ja emaka epiteelkoed. Hatud on heledat värvi, torujad ja/või tombulised esileküünlekujulised karbe ning soontega.
4. Viige puhtad hatud üle teise Petri tassi, mis sisaldab eelsoojendatud CHANG Amnio valmissöödet. Tehke lõplik puhastamine, kasutades hatudest kinnihaaramiseks pintsette, ja loksutage seejärel tasakesi. Mõlemad lõigatud CHANG Amnio puhastamiseks kõik ohtra on 5 mg. Arge kahjustage hargnid hatte.
5. Viige hatud ja sõõde üle 15 ml tsentrifuugikatsutisse ja lisage sellesse 4 tilka antibiootikumi (st gentamütsiinsulfaati, 50 µl/ml). Laske 30 minutit seista.
6. Tsentrifuugige hatte kiirusel u 1400 g/min 5 minutit.

Koorioni huntude proovi kultuur

1. Asipireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupellett peale umbes 0,5 ml sõõdet (või umbes kahekordse pellet kogus).
2. Resuspendeerige pellet õrnalt. Lisage tsentrifuugikatsutisse 2 ml eelsoojendatud CHANG Amnio sõõdet.
3. Lisage 2 ml tripsiin-EDTA-d ja inkubeerige kultuuri puutumatult 35–39 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris 10 minutit. Eemaldage katsuti inkubaatorist, resuspendeerige pellet ja asetage veel 10 minutiks inkubaatorisse.
4. Eemaldage inkubaatorist tsentrifuugikatsuti, suspendeerige rakupellett uuesti ja tsentrifuugige 8–10 minutit 1400 p/min juures.
5. Asipireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant. Resuspendeerige pellet, lisage katsutisse 1 ml kollagenaasi ja asetage 5 minutiks inkubaatorisse.
6. Eemaldage see inkubaatorist ja kontrolige visuaalselt, kas rakupellet on hägune ja kas selles on mähe mõrgatavaid hatude tükke. Kui rakupellet ei ole hägune, asetage see veel 5 minutiks tagasi inkubaatorisse.
7. Lisage tsentrifuugikatsutisse 3 ml eelsoojendatud CHANG Amnio sõõdet, et peatada kollagenaasi toimimine.
8. Tsentrifuugige katsutit 8–10 minutit 1400 p/min juures.
9. Asipireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupellett peale umbes 0,5 ml sõõdet. Resuspendeerige pellet ja lisage siis ettevalmistamisel kasutatud CHANG Amnio.
10. Valmistage ette optimaalne arv kulturee, kasutades iga kultuuri kohta 0,5 ml tootet CHANG Amnio iga Petri tassi puhul, mis sisaldab slaidi.
11. Inkubeerige kultuure puutumatult 35–39 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris.
12. 2. päeval kalte kultuurid üle 1,5 ml eelsoojendatud tootega CHANG Amnio.
13. 4 päeva järel tuleb kontrollida kultuuride kasvu. Kui tuvastate rakukasvu, eemaldage sõõde ja lisage igale slaidile 2 ml värsket eelsoojendatud tootet CHANG Amnio. Seejärel toitke kultuure iga 2 päeva järel. Veriste proovide korral võivad kultuurid vajada sagedasemat sõõtmevahetust.
14. Kontrollige kultuuride kasvu 5. päeval ning kogunge, kui tuvastate pisavaid kolooniad. Parimad tulemused saavutatakse kultuuride toitmisel tootega CHANG Amnio üks päev enne kogumist.

Toote CHANG Amnio kasutamine tõstetud looteveedeliku rakkude kasvatamiseks:

1. Sulatage CHANG Amnio ülaltoodud juhiste kohaselt.
2. Jaotage aseptiliselt sobiva suurusega alikvootideks ja külmutage uuesti.
3. Kui olete valmis kasutamiseks, sulatage alikvoodid 37 °C veevannis.
4. Võtke tõstmiseks tõddelge kulture trüpsiiniga (vektorase protease vms) nagu tavapärasel rakkude kasvatamisel tavalises sõõtmes. Proteaasiga töötlemist tuleb hoolikalt jälgida. CHANG Amnios kasvatatud looteveedeliku rakud kipuvad olema proteaasitõõtluse suhtes tundlikumad kui tavapärasues sõõtmes kasvatatud looteveedeliku rakud. Sellega arvestamiseks tuleb võib-olla muuta protokolli.

Märkus. Kultuuride sõõtmiseks kasutatava sõõtme pH peab jääma vahemikku 6,65–7,44 (st sõõtme väärus peab olema kergelt kollakas-roosa). pH-d saab kergesti reguleerida, kui asetada sõõde 5–8% CO_2 inkubaatorisse, jättes korgi kergelt avatuks umbes 30 minutiks.

5. Po wykonaniu 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.

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 trzeba być świadomym konieczności wprowadzenie zmian w protokole.
Uwaga: Wartość pH pożywki CHANG Amnio zasilanej hodowli musi mieścić się w zakresie 6,65–7,44 (tzn. kolor pożywki musi być lekko żółtawo-łososiowy). Wartość pH można bardzo łatwo wyregulować, umieszczając pożywkę w butelce z lekko odkręconą zakrętką w inkubatorze z atmosferą 5–8% CO_2 na około 30 minut.
Uwaga: Przy rozmrażaniu 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 kosmówki:

1. Oznaczyć szalkę Petriego danymi identyfikującymi 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% CO_2 nastawionej na temperaturę 35–39°C na 30 minut, aby krew osiadła na dnie.
2. Oczyścić próbkę, korzystając z mikroskopu stereoskopowego. Rozpocząć pracę przy powiększeniu 1,5X, a następnie zwiększyć powiększenie do 3X. Uwaga: Próbka kosmków kosmówki powinna ważyć około 20–40 mg.
3. Używając dwóch sterylnych szczypiec, usunąć z materiału kosmków kosmówki 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.
4. Przenieść oczyszczone kosmki na nową szalkę Petriego zawierającą wstępnie ogrzaną, kompletną pożywkę CHANG Amnio. Wykonać końcowe oczyszczanie, używając szczypiec do chwytania 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 próbówki wirówkowej o pojemności 15 ml i dodać 4 krople antybiotyku (tj. siarczanu gentamycyny, 50 µg/ml) do próbówki wirówkowej. Pozostawić na 30 minut.
6. Wirować kosmki przy ok. 1400 rpm przez 5 minut.

Przygotowanie hodowli z próbki kosmków kosmówki:

1. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając 0,5 ml pożywki nad osadem komórkowym (lub objętość równą około 2-krotnej objętości osadu).
2. Delikatnie zawiesić osad. Dodać 2 ml wstępnie ogrzanej pożywki CHANG Amnio do próbówki wirówkowej.
3. Dodać 2 ml trypsyny z EDTA i inkubować hodowlę w temperaturze 35–39°C, w atmosferze 5–8% CO_2 przez 10 minut, nie zakłócając jej. Wyciągnąć probówkę z inkubatora, ponownie zawiesić osad i umieścić w inkubatorze na dodatkowe 10 minut.
4. Wyciągnąć próbówkę z inkubatora, zawiesić osad i wirować przez 8–10 minut przy 1400 rpm.
5. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki. Zawiesić osad, a następnie dodać 1 ml kolagenazy do próbówki i umieścić w inkubatorze na 5 minut.
6. Wyciągnąć próbówkę z inkubatora, wizualnie sprawdzić, czy osad jest mętny i czy nie widać wyraźnych kawałków pojedynczych kosmków. Jeśli osad nie jest mętny, ponownie umieścić probówkę w inkubatorze na kolejne 5 minut.
7. Dodać 3 ml wstępnie ogrzanej pożywki CHANG Amnio do próbówki wirówkowej, aby zatrzymać działanie kolagenazy.
8. Wirować próbówkę przez 8–10 minut przy 1400 rpm.
9. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając 0,5 ml pożywki nad osadem komórkowym. Zawiesić osad przed dodaniem pożywki CHANG Amnio używanej do nastawiania hodowli.
10. Nastawić odpowiednią liczbę hodowli, używając 0,5 ml pożywki CHANG Amnio na hodowlę dla każdej szalki Petriego ze szkiełkiem nakrywkowym.
11. Inkubować hodowle w temperaturze 35–39°C w atmosferze 5–8% CO_2, nie zakłócając ich.
12. W dniu 2. zalać hodowle, dodając 1,5 ml wstępnie ogrzanej pożywki CHANG Amnio.
13. Po 4 dniach sprawdzić wzrost hodowli. W przypadku zaobserwowania wzrostu usunąć pożywkę, a następnie dodać 2 ml świeżej, wstępnie ogrzanej pożywki CHANG Amnio na każde szkiełko nakrywkowe. Po wykonaniu tej czynności zalecane jest zasilanie hodowli pożywką co 2 dni. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożywki.
14. Sprawdzić wzrost hodowli w 5. dniu lub w późniejszych dniach i zebrać komórki, jeśli zaobserwowano wystarczającą liczbę kolonii.
15. Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowle pożywką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

Stosowanie pożywki CHANG Amnio do wzrostu pierwotnych: metody hodowli w butelkach hodowlanych

1. Wirować płyn owodniowy przy prędkości około 1200 rpm przez 10 minut, aby zatęzyć komórki.
2. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając ok. 0,5 ml roztworu nad osadem komórkowym (lub objętość równą około 2-krotnej objętości osadu) odwirowanego płynu owodniowego. Rozdzielić nadsącz na porcje (co najmniej o objętości 1 ml, jeśli jest to możliwe) w celu oznaczenia alfa-proteiny (AFP) i acetylocholinesterazy, jeśli jest to konieczne. Jeśli próbka zawiera krew, przygotować dodatkową porcję do dalszych testów. Zawieść osad komórkowy w małej objętości płynu owodniowego pacjentki. Dodać wystarczającą ilość pożywki CHANG Amnio do zatężonej zawiesiny komórkowej, aby uzyskać końcową objętość posiewu równą 0,5 ml na szkiełko nakrywkowe (łącznie 4 szkiełka nakrywkowe, w zależności od rozmiaru osadu komórkowego) lub 2 ml na butelkę hodowlaną. Jeśli próbkę pobrano od pacjentki w trzecim trymestrze ciąży, osadu może być więcej, ale może on zawierać mniej żywe komórki, z tego względu konieczny będzie bardziej stężony posiew (mniej pożywki niż zwykle).
3. Inkubować hodowle w temperaturze 37°C w atmosferze 5–8% CO_2, nie zakłócając ich.
4. W dniu 2. zalać hodowle, dodając 2 ml pożywki CHANG Amnio.
5. Po 4–5 dniach sprawdzić wzrost hodowli. Po zaobserwowaniu wzrostu należy zasilić hodowle pożywką. Zasilać hodowle pożywką, usuwając cały nadsącz hodowli i zastępując go 2 ml świeżej pożywki CHANG Amnio. Po wykonaniu tej czynności zalecane jest zasilanie hodowli pożywką co 2 dni. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożywki.
6. Sprawdzić wzrost hodowli w 5. dniu lub w późniejszych dniach i zebrać komórki, jeśli zaobserwowano wystarczającą liczbę kolonii.
7. Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowle pożywką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

Stosowanie pożywki CHANG Amnio dla hodowli pierwotnych: metody hodowli w butelkach hodowlanych

1. Wirować płyn owodniowy przy prędkości około 1200 rpm przez 10 minut, aby zatęzyć komórki.
2. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając ok. 0,5 ml roztworu nad osadem komórkowym (lub objętość równą około 2-krotnej objętości osadu) odwirowanego płynu owodniowego. Rozdzielić nadsącz na porcje (co najmniej o objętości 1 ml, jeśli jest to możliwe) w celu oznaczenia alfa-proteiny (AFP) i acetylocholinesterazy, jeśli jest to konieczne. Jeśli próbka zawiera krew, przygotować dodatkową porcję do dalszych testów. Zawieść osad komórkowy w małej objętości płynu owodniowego pacjentki. Dodać 4 ml pożywki CHANG Amnio do całkowitej objętości równej 5 ml na butelkę. Jeśli próbkę pobrano od pacjentki w trzecim trymestrze ciąży, osadu może być więcej, ale może on zawierać mniej żywe komórki, z tego względu konieczny będzie bardziej stężony posiew (mniej pożywki niż zwykle).
3. Inkubować hodowle w temperaturze 37°C w atmosferze 5%–8% CO_2, nie zakłócając ich.
4. Drugi dan natopiti kulture dodajnjem 2 ml proizvoda CHANG Amnio.
5. Nakon 4 do 5 dana provjeriti rast kulture. Hraniti kulture nakon što se zabilježi rast. Za hranjenje kulture ukloniti sav supernatant kulture i zamijeniti ga s 2 ml svježeg proizvoda CHANG Amnio. Preporučuje se da nakon toga kulture hrane svaka 2 dana. Medij će se možda morati češće mijenjati za kulture kravvih uzoraka.
6. Peti dan ili nakon petog dana provjeriti rast kulture i prikupiti ih kada bude zabilježena dovoljna količina kolonija.
7. Najbolji rezultati postižu se kada se kulture hrane proizvodom CHANG Amnio dan prije prikupljanja.

Upotreba proizvoda CHANG Amnio za primarne kulture: metode u tikvici

1. Centrifugirati amnijsku tekućinu 10 minuta na otprilike 1.200 o/min kako bi se stanice koncentrirale.
2. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete tako da u njoj ostane otprilike 0,5 ml supernatanta (ili količina supernatanta oko 2x veća od volumena taloga) iznad taloga stanica centrifugirane amnijske tekućine. Ako je potrebno, alikvotirati supernatant (ako je moguće, najmanje 1 ml) za analizu alfa-fetoproteina (AFP) i acetil-kolinesteraze. Ako je uzorak krvav, pripremiti dodatni alikvot za daljnje pretrage. Obnoviti suspenziju taloga stanica u malom volumenu pacijentičine vlastite amnijske tekućine. Dodati 4 ml proizvoda CHANG Amnio kako bi se postigao konačan volumen od 5 ml po tikvici. Ako je uzorak prikupljen od pacijentice u trećem trimjesečju trudnoće, talog može biti veći, no sadržavati manje vijabilnih stanica te će mu biti potrebno gušće nasađivanje (u manjoj količini medija nego što je uobičajeno).
3. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 – 8 % CO_2.
4. Drugi dan natopiti kulture dodavanjem 2 ml proizvoda CHANG Amnio.
5. Nakon 4 do 5 dana provjeriti rast kulture. Hraniti kulture nakon što se zabilježi rast. Za hranjenje kulture ukloniti sav supernatant kulture i zamijeniti ga s 2 ml svježeg proizvoda CHANG Amnio. Preporučuje se da nakon toga kulture hrane svaka 2 dana. Medij će se možda morati češće mijenjati za kulture kravvih uzoraka.
6. Peti dan ili nakon petog dana provjeriti rast kulture i prikupiti ih kada bude zabilježena dovoljna količina kolonija.
7. Najbolji rezultati postižu se kada se kulture hrane proizvodom CHANG Amnio dan prije prikupljanja.

Upotreba proizvoda CHANG Amnio za primarne kulture: metode u bočicama

1. Centrifugirati amnijsku tekućinu 10 minuta na otprilike 1.200 o/min kako bi se stanice koncentrirale.
2. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete tako da u njoj ostane otprilike 0,5 ml supernatanta (ili količina supernatanta oko 2x veća od volumena taloga) iznad taloga stanica centrifugirane amnijske tekućine. Ako je potrebno, alikvotirati supernatant (ako je moguće, najmanje 1 ml) za analizu alfa-fetoproteina (AFP) i acetil-kolinesteraze. Ako je uzorak krvav, pripremiti dodatni alikvot za daljnje pretrage. Obnoviti suspenziju taloga stanica u malom volumenu pacijentičine vlastite amnijske tekućine. Dodati 4 ml proizvoda CHANG Amnio kako bi se postigao ukupan volumen od 5 ml po tikvici. Ako je uzorak prikupljen od pacijentice u trećem trimjesečju trudnoće, talog može biti veći, no sadržavati manje vijabilnih stanica te će mu biti potrebno gušće nasađivanje (u manjoj količini medija nego što je uobičajeno).
3. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 – 8 % CO_2.
4. Drugi dan natopiti kulture dodavanjem 2 ml proizvoda CHANG Amnio.
5. Nakon 4 do 5 dana provjeriti rast kulture. Hraniti kulture nakon što se zabilježi rast. Za hranjenje kulture ukloniti sav supernatant kulture i zamijeniti ga s 2 ml svježeg proizvoda CHANG Amnio. Preporučuje se da nakon toga kulture hrane svaka 2 dana. Medij će se možda morati češće mijenjati za kulture kravvih uzoraka.
6. Peti dan ili nakon petog dana provjeriti rast kulture i prikupiti ih kada bude zabilježena dovoljna količina kolonija.
7. Najbolji rezultati postižu se kada se kulture hrane proizvodom CHANG Amnio dan prije prikupljanja.

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. Próbki pożywki CHANG Amnio są poddawane testom pod kątem możliwego zanieczyszczenia bakteryjnego zgodnie z protokołem badania sterylności opisanym w najnowszych badaniu sterylności wg Farmakopei Amerykańskiej (USP) <71>.

PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA

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

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

BILEŞENLER

Tampon/bar
Sodyum bikarbonat
Antioksidan
Tiyoltik asit
Antibiyotik
Gentamisin sülfat
Amino Asit
Alanin
Arjinin
Asparajin
Aspartik Asit
Sistein
Glutamik Asit
Glutamin
Glisin
Histidin
İzolösin
Lösin
Lizin
Metionin
Fenilalanin
Prolin
Serin
Treonin
Triptofan
Tirozin
Valin
Vitamin
Choline chloride
Folic acid
Niacinamide
Pantothenate
Pyridoxine
Riboflavin
Thiamine
Vitamin A
Vitamin B12
Vitamin C
Vitamin D2
Vitamin E
Karbohidrat Kaynağı
Glukoz
Piruvat
Inositol
Tuzlar ve İyonlar
Sodyum klorür
Sodyum selenit
Kalsiyum klorür
Potasyum klorür
Sodyum sülfat
Potasyum fosfat
Protein, hormon ve büyüme faktörleri
Fetal sığır serumu (FBS)
Serum normoferme
İnsan transferrin
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
İnsülin
Progesteron
Testosteron
Beta östradiol
Hidrokortizon
pH göstergesi
Fenol kırmızısı
Enerji Substratları
Glukoz
Piruvat
Inositol
Soolad ja joonid
Naatriumkloriid
Naatriumselenit
Kaltsiumkloriid
Kaliumkloriid
Kaaliumfosfaat
Magneesiumsulfaat
Naatriumfosfaat
Nükleik Asitler
Deoksiadenosin
Deoksisitidin
Deoksiguanosin
Adenosin
Tüsidin
Guanosin
Timidin
Uridin
Diğer
Etil alkol
Türonin

KALİTE GÜVENCE

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 steriliite testi protokolü izlenerek olası bakteriyoloji 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 ALİKOTLAMA

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

TÜRKÇE

KULLANMA TALİMATI

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

Hücre pasajı yapmak için kültürlere hücreler geleneksel vasata önerildiğinde normalde yapacağınız gibi tripsin (veya Pronase vs.) muamelesi yapın. Ancak proteaz tedavisi dikkatle izlenmelidir. CHANG Amnio içinde büyütülen amniyotik sıvı hücreleri geleneksel vasatta büyütülenlere göre proteaz tedavisine daha duyarlı olma eğilimindedir. Protokolünüzü bunu hesaba alacak şekilde değiştirmek gerekebilir.
Not: Kültürleri beslemek için kullanılan vasatın pH değeri 6,65 - 7,44 olmalıdır (yanı vasat hafif sarımsı pembe olmalıdır). pH değeri, vasatı kapağı hafifçe gevşetilmiş olarak yaklaşık 30 dakika boyunca bir %5 - %8 CO_2 inkübatörüne yerleştirerek kolayca ayarlanabilir.
Not: Chang Amnio ürününde çözme sonrasında bir miktar Kalsiyum Oksalat ve protein presipitatı gelişebiliyor. Bu ürünün kalitesini veya performansı üzerine bir etkisi bilinmemektedir.

Koryonik Villus Örneği Hazırlama:

1. 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 çökmesini sağlamak üzere 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferinde bir inkübatöre 30 dakika yerleştirin.
2. Numuneyi bir diseksiyon mikroskobu altında başlangıçta 1,5x büyütmeyle ve sonra yaklaşık 3x büyümeyle temizleyin. Not: Yaklaşık 20 - 40 mg koryonik villus örneği gerekecektir.
3. İki steril forseps kullanarak diseksiyon mikroskobu altında tabak içinde çalışma yoluyla villus materyalinden herhangi bir maternal desidua materyalini ve kan pıhtılarını giderin. Villus materyali görünür dallar ve toplardamarlarla birlikte açık renkli ve tübüler ve/veya topaklı durumdadır.
4. 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.
5. Villuslar ve vasatı bir 15 ml santrifüj tüpüne aktarın ve santrifüj tüpüne 4 damla antibiyotik (örn. Gentamisin Sülfat, 50 µL/mL) ekleyin. 30 dakika bekleyin.
6. Villusları 5 dakika boyunca yaklaşık 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.

Koryonik Villus Örneği Kültürü:

1. Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 ml (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) vasat bıraktığınızdan emin olun.
2. Pelleti yavaşça tekrar süspansiyon haline getirin. Santrifüj tüpüne önceden ısıtılmış 2 ml CHANG Amnio vasatı ekleyin.
3. 2 ml. Tripsin EDTA ekleyin ve kültürü bozulmadan 10 dakika boyunca 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin. Tüpü inkübatörden çıkarın, pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve inkübatöre 10 dakika daha koyun.
4. Santrifüj tüpünü inkübatörden çıkarın, pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.
5. Süpernatanı santrifüjlenmiş tüpten aspire edin. Pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve sonra tüpe 1 ml. kollajenaz ekleyip 5 dakikalığına inkübatöre koyun.
6. İnkübatörden çıkarın ve pelletin bulanık olup olmadığını ve ayrı villus parçalarının görülüp görülemediğini görsel olarak doğrulayın. Pellet bulanık değilse 5 dakikalığına daha tekrar inkübatöre koyun.
7. Kollajenaz etkisini durdurmak için santrifüj tüpüne 3 ml. önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyin.
8. Tüpü 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.
9. 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.
10. Bir lamel içeren her petri tabağı için kültür başına 0,5 ml. CHANG Amnio kullanarak optimum sayıda kültür oluşturun.
11. Kültürleri ellemeden 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
12. Kültürleri gün 2'de 1,5 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıyla örtün.
13. 4 günde kültürler üzerine açısından kontrol edilmelidir. Kültürlerin gün performansı üzerine bir etkisi bilinmemektedir.

Koryonik Villus Örneği Hazırlama:

1. 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 çökmesini sağlamak üzere 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferinde bir inkübatöre 30 dakika yerleştirin.
2. Numuneyi bir diseksiyon mikroskobu altında başlangıçta 1,5x büyütmeyle ve sonra yaklaşık 3x büyümeyle temizleyin. Not: Yaklaşık 20 - 40 mg koryonik villus örneği gerekecektir.
3. İki steril forseps kullanarak diseksiyon mikroskobu altında tabak içinde çalışma yoluyla villus materyalinden herhangi bir maternal desidua materyalini ve kan pıhtılarını gideriniz. Villus materyali görünür dallar ve toplardamarlarla birlikte açık renkli ve tübüler ve/veya topaklı durumdadır.
4. 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.
5. Villuslar ve vasatı bir 15 ml santrifüj tüpüne aktarın ve santrifüj tüpüne 4 damla antibiyotik (örn. Gentamisin Sülfat, 50 µL/mL) ekleyin. 30 dakika bekleyin.
6. Villusları 5 dakika boyunca yaklaşık 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.

Koryonik Villus Örneği Kültürü:

1. 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.
2. Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 0,5 ml (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) santrifüje edilmiş amniyotik sıvı kültürünü 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 fläsket başına 2 mL olacak şekilde son plakalama hacmini mümkün kılmak üzere yeterli CHANG Amnio ekleyin. Numune gebeliğin 3. trimesterinde ise hastadan alınırsa pellet daha büyük olabilir ama daha az canlı hücre içerebilir ve bu nedenle daha yoğun tohumlama gerektirebilir (normalden daha az vasat).
3. Kültürleri ellemeden 37°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
4. Gün 5'te çimrik için kontrol edin. Vasatı 2 mL yeni CHANG Amnio ile değiştirin ve yeterli hücre üremesi gözlenirse toplayın.
5. Kültürlerin üreme durumunu kontrol edin ve bundan sonra yeterli koloni gözlenene ve toplamaya hazır olana kadar her gün vasatı tamamen değiştirin. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
6. En iyi sonuçlar kültürlerin toplama öncesi günde CHANG Amnio ile beslenmesiyle alınır.

Primer Kültürler için CHANG Amnio Kullanımı: Flask Metodolojileri

1. Hücreleri konsantre etmek için amniyotik sıvıyı 10 dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.
2. 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).
3. Kültürleri ellemeden 37°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
4. Gün 5'te çimrik için kontrol edin. Vasatı 2 mL yeni CHANG Amnio ile değiştirin ve yeterli hücre üremesi gözlenirse toplayın.
5. Kültürlerin üreme durumunu kontrol edin ve bundan sonra yeterli koloni gözlenene ve toplamaya hazır olana kadar her gün vasatı tamamen değiştirin. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
6. En iyi