



## 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.

*În vitro* diagnostik kullannm için.

Na diagnostické použitie *in vitro*.

За *in vitro* диагностична употреба.

Za upotrebu *in vitro* dijagnostici.

Ghal užu dijanjostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

### Glossary of Symbols\*:

	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 - Prinsessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands

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

### 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<sub>2</sub> incubators (cultures equilibrated with 5%-8% CO<sub>2</sub> 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> Sodium bicarbonate	<u>Proteins, Hormones, and Growth Factors</u> Fetal bovine serum (FBS) Newborn bovine serum Human transferrin Fibroblast growth factor (FGF) Insulin Progesterone Testosterone Beta estradiol Hydrocortisone	Magnesium sulfate Sodium phosphate
<u>Antioxidant</u> Thioctic acid	<u>Nucleic acids</u> Deoxyadenosine Deoxycytidine Deoxyguanosine Adenosine Cytidine Guanosine Thymidine Uridine	
<u>Antibiotic</u> Gentamicin Sulfate	<u>Other</u> Ethyl alcohol Thyronine	
<u>Amino Acid</u> Alanine Arginine Asparagine Aspartic Acid Cysteine Glutamic Acid Glutamine Glycine Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalanine Proline Serine Threonine Tryptophan Tyrosine Valine	<u>pH Indicator</u> Phenol red	<u>Vitamins and trace elements</u> Ascorbic acid Folic acid Nicotinamide Riboflavin Thiamine Pantothenic acid Cobalamin Pyridoxine Biotin
	<u>Energy Substrates</u> Glucose Pyruvate Inositol	<u>Water</u> 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. 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 rapidly by swirling 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)

1. 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).
2. Incubate cultures undisturbed at 37°C 5%-8% CO<sub>2</sub> atmosphere.
3. Flood cultures on day 2 by adding 2 mL of CHANG Amnio.
4. 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.
5. Check cultures for growth on, or after, day 5, and harvest when sufficient colonies are observed.
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<sub>2</sub> 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 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% CO<sub>2</sub> incubator with the cap slightly loosened for about 30 minutes.

#### Use of CHANG Amnio for dissection of CVS:

1. Obtain one 100 mm X 15 mm petri dish divided into 2 partitions and one 60 mm X 15 mm petri dish. Dispense 2 mL of media (without serum) in the smaller petri dish. Dispense 4 mL of the media in one partition of the large petri dish and 6 mL of media in the other partition of the same dish.
2. Carefully aspirate media and villi from the original centrifuge tube containing the patient sample. Dispense media and villi into the partition of the larger

1. petri dish with 4 mL of aspiration media.
2. Using an inverted microscope and two sterile forceps, remove blood clots and any maternal decidua present from the exterior of the chorionic villi. Be careful to avoid damaging the fragile villi. Transfer the cleaned villi to the 6 mL partition of the larger petri dish.
3. Perform a final cleaning, using forceps to grasp villi and agitate gently while immersed in the media to remove any excess decidua, blood clots or debris. Choose villi with visible branches and veins, if possible. Determine the amount of villi present to prepare the optimal number of cultures (5 mg is ideal amount to use per culture; don't set up more than 20 mg of villi).
4. Place cleaned villi into smaller petri dish with 2 mL of media (without serum) using forceps and then transfer villi and media to a 15 mL centrifuge tube.

#### Use of CHANG Amnio for Primary Cultures of CVS

1. Add 4 drops of antibiotic (ie. Gentamicin Sulfate, 50 µg/mL) to the centrifuge tube and let sit for 30 minutes.
2. Centrifuge villi at approx. 1,400 rpm for 5 minutes.
3. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving 0.5 mL of media above cell pellet (or about 2x volume of pellet).
4. Gently resuspend pellet. Add 2 mL of CHANG Amnio media to centrifuge tube.
5. Repeat steps 2-3. Add 2 mL of trypsin and incubate culture undisturbed at 37°C, 5%-8% CO<sub>2</sub> atmosphere for 10 minutes. Remove tube from incubator, resuspend pellet and place in incubator for 10 additional minutes.
6. Remove centrifuge tube from incubator, resuspend pellet and centrifuge for 8-10 minutes at 1,400 rpm.
7. Aspirate supernatant from the centrifuged tube. Resuspend pellet, then add 1 mL of collagenase to tube and place in incubator for 5 minutes.
8. Remove from incubator and visually check to see if pellet is cloudy and no distinct individual pieces of villi can be seen. If pellet is not cloudy, place back in incubator for 5 minutes.
9. Repeat step 8 until pellet is cloudy. Add 3 mL of CHANG Amnio to centrifuge tube to stop the action of the collagenase.
10. Centrifuge tube for 8-10 minutes at 1,400 rpm.
11. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving 0.5 mL of media above cell pellet (or about 2x volume of pellet). Resuspend pellet before adding CHANG Amnio used for set up.
12. Set up optimal number of cultures (approx. 1 culture per every 5 mg of villi used) using 0.5 mL of CHANG Amnio per culture for each petri dish containing a coverslip.
13. Incubate cultures undisturbed at 37°C 5%-8% CO<sub>2</sub> atmosphere.
14. Flood cultures on day 2 by adding 1.5 mL of CHANG Amnio.
15. At 4 days, cultures should be checked for growth. If growth is observed, remove media and add 2 mL of fresh CHANG Amnio to each coverslip. Cultures should be fed every 2 days thereafter. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
16. Check cultures for growth on day 5, and harvest when sufficient colonies are observed.
17. 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<sub>2</sub>-Inkubatoren entwickelt (Kulturen, die mit 5–8%iger CO<sub>2</sub>-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

<b>Puffer</b>	<b>Proteine, Hormone und Wachstumsfaktoren</b>	<b>Nukleinsäuren</b>
Natriumbicarbonat	Fetales Kälberserum (FBS)	Desoxyadenosin
<b>Antioxidans</b>	Serum von neugeborenen Rindern	Desoxycytidin
Thioctansäure	Humanes Transferrin	Desoxyguanidin
<b>Antibiotikum</b>	Fibrinolytische Wachstumsfaktoren	Adenosin
Gentamicinsulfat	Alanin	Cytidin
<b>Aminosäure</b>	Arginin	Guanosin
Alanin	Asparagin	Thymidin
Arginin	Asparaginsäure	Uridin
Asparagin	Cystein	<b>Andere</b>
Asparaginsäure	Glutaminsäure	Ethylalkohol
Cystein	Glutaminsäure	Thyronin
Glutaminsäure	Glutamin	<b>Vitamine und Spurenelemente</b>
Glutamin	Leucin	Ascorbinsäure
Histidin	Lysin	Folsäure
Isoleucin	Methionin	Nikotinamid
Leucin	Phenylalanin	Wasser für Injektionszwecke (WFI)
Lysin	Prolin	
Methionin	<b>Salze und Ionen</b>	
Phenylalanin	Natriumchlorid	
Prolin	Natriumselenit	
Serin	Calciumchlorid	
Threonin	Cholinchlorid	
Tryptophan	Kaliumchlorid	
Tyrosin	Kaliumphosphat	
Valin	Magnesiumsulfat	
	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 Sterilitätstestprotokoll befolgt wurde.

### VORBEREITUNG

Schnell auftauen, dazu das Fläschchen in einem 37 °C warmen Wasserbad schwenken.

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 Zentrifugenröhrchen 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 CO<sub>2</sub>-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 Zentrifugenröhrchen 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<sub>2</sub>-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 für ungefähr 30 Minuten in einen 5–8%igen CO<sub>2</sub>-Inkubator mit leicht gelöster Kappe gestellt wird.

Verwendung von CHANG Amnio für die Dissektion der Chorionzottenbiopsie (CVS):

1. Eine 100 mm x 15 mm große zweigeteilte Petrischale und eine 60 mm x 15 mm große Petrischale bereitstellen. 2 ml Medium (ohne Serum) in die kleinere Petrischale geben. 4 ml des Mediums in eine Hälfte der großen Petrischale und 6 ml Medium in die andere Hälfte derselben Schale geben.
2. Medien und Zotten vorsichtig aus dem ursprünglichen Zentrifugenröhrchen mit der Patientenprobe aspirieren. Medien und Zotten mit 4 ml Aspirationsmedium in eine Hälfte der größeren Petrischale abgeben.
3. Mithilfe eines inversen Mikroskops und zwei sterilen Pinzetten Blutgerinnsel und eventuell vorhandene Decidua um die Chorionzotten herum entfernen. Darauf achten, die empfindlichen Zotten nicht zu beschädigen. Die gereinigten Zotten in die 6-ml-Hälfte der größeren Petrischale übertragen.
4. Eine abschließende Reinigung durchführen, dazu die Zotten mit einer Pinzette greifen und vorsichtig im Medium hin und her bewegen, um überschüssige Decidua, Blutgerinnsel oder Debris zu entfernen. Nach Möglichkeit Zotten mit sichtbaren Ästen und Venen herauszusuchen. Die Menge an vorhandenen Zotten bestimmen, um die optimale Anzahl an Kulturen vorzubereiten (5 mg ist die ideale Menge pro Kultur, nicht mehr als 20 mg Zotten ansammeln).
5. Gereinigte Zotten mit einer Pinzette in die kleinere Petrischale mit 2 ml Medium (ohne Serum) geben und dann Zotten und Medium in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen.

Verwendung von CHANG Amnio für Primärkulturen der Chorionzottenbiopsie (CVS)

1. 4 Tropfen Antibiotikum (d. h. Gentamicinsulfat, 50 µg/ml) in Zentrifugenröhrchen geben und 30 Minuten einwirken lassen.
2. Die Zotten 5 Minuten bei ca. 1.400 U/min zentrifugieren.
3. So viel Überstand vom Zentrifugenröhrchen absaugen, dass 0,5 ml Medium über dem Zellpellet (oder etwa das 2-fache Volumen des Pellets) verbleiben.
4. Das Pellet vorsichtig resuspendieren. 2 ml CHANG Amnio Medium in das Zentrifugenröhrchen geben.
5. Schritte 2–3 wiederholen. 2 ml Trypsin zugeben und die Kultur ungestört 10 Minuten bei 37 °C in einer 5–8%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubieren. Das Röhrchen aus dem Inkubator nehmen, das Pellet resuspendieren und für weitere 10 Minuten in den Inkubator stellen.
6. Das Zentrifugenröhrchen aus dem Inkubator nehmen, Pellet resuspendieren und 8–10 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugieren.
7. Überstand vom zentrifugierten Röhrchen absaugen. Pellet resuspendieren, dann 1 ml Kollagenase in das Röhrchen geben und 5 Minuten in den Inkubator stellen.
8. Aus dem Inkubator nehmen und visuell prüfen, ob das Pellet trüb ist und keine einzelnen Zottenstücke sichtbar sind. Wenn das Pellet nicht trüb ist, für weitere 5 Minuten in den Inkubator stellen.
9. Schritt 8 wiederholen, bis das Pellet trüb ist. 3 ml CHANG Amnio in das Zentrifugenröhrchen geben, um die Wirkung der Kollagenase zu stoppen.
10. Das Zentrifugenröhrchen 8–10 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugieren.
11. So viel Überstand vom Zentrifugenröhrchen absaugen, dass 0,5 ml Medium über dem Zellpellet (oder etwa das 2-fache Volumen des Pellets) verbleiben. Das Pellet vor der Zugabe von CHANG Amnio zur Vorbereitung

resuspendieren.

12. Die optimale Anzahl von Kulturen (ca. 1 Kultur pro 5 mg Zotten) mit 0,5 ml CHANG Amnio pro Kultur für jede Petrischale mit Deckglas vorbereiten.
13. Die Kulturen ungestört bei 37 °C in einer 5–8%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubieren.
14. Die Kulturen an Tag 2 überspülen, indem 1,5 ml CHANG Amnio zugegeben werden.
15. Nach 4 Tagen sollten die Kulturen auf Wachstum überprüft werden. Wenn Wachstum beobachtet wird, das Medium entfernen und 2 ml frisches 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.
16. An Tag 5 die Kulturen auf Wachstum prüfen und entnehmen, wenn ausreichend Kolonien vorhanden sind.
17. 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 Tiefkühlung 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.

**INDICAZIONI PER L'USO**

CHANG Amnio con gentamicina e L-glutammina 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 campionamento di villi corionici.

Questo terreno può essere usato in incubatori con CO<sub>2</sub> (colture equilibrate con atmosfera al 5-8% di CO<sub>2</sub>).

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 per colture primarie di cellule di liquido amniotico (AFC) umano, campionamento di villi corionici (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**

<b>Tamponi</b>	<b>Proteine, ormoni e fattori di crescita</b>	<b>Acidi nucleici</b>
Bicarbonato di sodio	Siero bovino fetale	Deossitiadenosina
	Siero bovino neonatale	Deossiguanosina
<b>Antiossidante</b>	Transferrina umana	Adenosina
Acido tiotico	Fattore di crescita dei fibroblasti	Citidina
<b>Antibiotico</b>	Insulina	Guanosina
Gentamicina solfato	Progesterone	Timidina
	Testosterone	Uridina
<b>Aminoacidi</b>	Beta estradiolo	<b>Altro</b>
Alanina	Idrocortisone	Alcol etilico
Arginina		Tironina
Asparagina	<b>Indicatore di pH</b>	<b>Vitamine ed elementi in tracce</b>
Acido aspartico	Rosso fenolo	Acido ascorbico
Cisteina		Acido folico
Acido glutammico	<b>Substrati energetici</b>	Nicotinamide
Glutammina	Glucosio	Nicobioflavina
Glicina	Piruvato	Tiamina
Istidina	Inositolo	Acido pantotenico
Isoleucina		Cobalamina
Leucina	<b>Sali e ioni</b>	Piridossina
Lisina	Cloruro di sodio	Biotina
Metionina	Selenito di sodio	
Fenilalanina	Cloruro di calcio	<b>Acqua</b>
Prolina	Cloruro di colina	Qualità WFI (acqua per iniezioni)
Serina	Cloruro di potassio	
Treonina	Fosfato di potassio	
Triptofano	Solfato di magnesio	
Tirosina	Fosfato di sodio	
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**

Scongelerlo rapidamente agitando 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. Scongelerlo CHANG Amnio seguendo le istruzioni di cui sopra.
2. Distribuire in condizioni asettiche in aliquote di dimensioni appropriate e ricongelare.
3. Scongelerlo 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 1200 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. Risospendere 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 CO<sub>2</sub>.
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 1200 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. Risospendere 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 CO<sub>2</sub>.
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 facilmente regolato ponendo il terreno in un incubatore con CO<sub>2</sub> al 5-8% con il tappo leggermente svitato per circa 30 minuti.

Uso di CHANG Amnio per dissezione di CVS

1. Preparare una piastra di Petri da 100 mm x 15 mm divisa in 2 partizioni e una piastra di Petri da 60 mm x 15 mm. Dispensare 2 ml di terreno (senza siero) nella piastra di Petri più piccola. Dispensare 4 ml di terreno in una partizione della piastra di Petri più grande e 6 ml di terreno nell'altra partizione della stessa piastra.
2. Aspirare con attenzione il terreno e i villi dalla provetta per centrifuga originale contenente il campione della paziente. Dispensare il terreno e i villi nella partizione della piastra di Petri più grande con 4 ml di terreno di aspirazione.
3. Mediante un microscopio invertito e due pinze

sterili, rimuovere i coaguli di sangue ed eventuale tessuto materno deciduo presente dall'esterno dei villi corionici. Prestare attenzione a non danneggiare i villi, particolarmente fragili. Una volta puliti, trasferire i villi nella partizione da 6 ml della piastra di Petri più grande.

4. Eseguire una pulizia finale, afferrando i villi con le pinze e scuotendoli delicatamente mentre sono immersi nel terreno, per rimuovere eventuale tessuto deciduo, coaguli di sangue o residui. Scegliere se possibile i villi che presentano ramificazioni e vene visibili. Determinare la quantità di villi presenti per preparare il numero ottimale di colture (5 mg è la quantità ideale da utilizzare per ogni coltura; non predisporre più di 20 mg di villi).
5. Usando le pinze, porre i villi puliti nella piastra di Petri più piccola con 2 ml di terreno (senza siero), quindi trasferire i villi e il terreno in una provetta per centrifuga da 15 ml.

Uso di CHANG Amnio per colture primarie di CVS

1. Aggiungere 4 gocce di antibiotico (cioè, gentamicina solfato, 50 µg/ml) alla provetta per centrifuga e lasciare riposare per 30 minuti.
2. Centrifugare i villi a circa 1400 giri/min per 5 minuti.
3. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata, lasciando circa 0,5 ml di terreno sopra il pellet cellulare (o circa 2 volte il volume di pellet).
4. Risospendere delicatamente il pellet. Aggiungere 2 ml di terreno CHANG Amnio alla provetta per centrifuga.
5. Ripetere i punti 2 e 3. Aggiungere 2 ml di tripsina e incubare la coltura indisturbata a 37 °C in atmosfera al 5-8% di CO<sub>2</sub> per 10 minuti. Rimuovere la provetta dall'incubatore, risospendere il pellet e porre in incubatore per altri 10 minuti.
6. Rimuovere la provetta dall'incubatore, risospendere il pellet e centrifugare per 8-10 minuti a 1400 giri/min.
7. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata. Risospendere il pellet, quindi aggiungere 1 ml di collagenasi alla provetta e porre in incubatore per 5 minuti.
8. 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 5 minuti.
9. Ripetere il punto 8 finché il pellet non si presenta torbido. Aggiungere 3 ml di CHANG Amnio alla provetta per centrifuga per interrompere l'attività della collagenasi.
10. Centrifugare per 8-10 minuti a 1400 giri/min.
11. Aspirare il surnatante dalla provetta centrifugata, lasciando circa 0,5 ml di terreno sopra il pellet cellulare (o circa 2 volte il volume di pellet). Sospendere nuovamente il pellet prima di aggiungere il CHANG Amnio usato per la preparazione.
12. Preparare un numero ottimale di colture (circa 1 coltura ogni 5 mg di villi usati) usando 0,5 ml di CHANG Amnio per coltura per ogni piastra di Petri contenente un vetrino coprioggetti.
13. Incubare le colture indisturbate a 37 °C in atmosfera al 5-8% di CO<sub>2</sub>.
14. Al giorno 2, aggiungere alle colture 1,5 ml di CHANG Amnio.
15. Al giorno 4, verificare la crescita delle colture. Se si osserva una crescita, rimuovere il terreno e aggiungere 2 ml di CHANG Amnio fresco 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.
16. Controllare la crescita delle colture al giorno 5 e raccogliere quando si osservano sufficienti colonie.
17. 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:

1. cultivo primario de células de líquido amniótico
2. expansión de células de líquido amniótico subcultivadas
3. tejido amniótico sólido (muestreo de vellosidades coriónicas).

Este medio se ha diseñado para su uso en incubadoras de CO<sub>2</sub> (cultivos equilibrados en una atmósfera con 5-8 % de CO<sub>2</sub>).

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

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

1. Descongelar el CHANG Amnio según las instrucciones anteriores.
2. Repartir en alícuotas de tamaño adecuado en condiciones asepticas y volver a congelar.
3. 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*

1. Centrifugar el líquido amniótico a unos 1200 rpm durante 10 minutos para concentrar las células.
2. 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 sanguínea, 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 frasquito. 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).
3. Incubar los cultivos sin perturbaciones a 37 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO<sub>2</sub>.
4. Inundar los cultivos el día 2 añadiendo 2 ml de CHANG Amnio.
5. 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 sanguíneas, los cultivos pueden requerir cambios más frecuentes de los medios.
6. Comprobar el crecimiento de los cultivos a partir del día 5 y cosecharlos cuando se observen suficientes colonias.
7. 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

1. Centrifugar el líquido amniótico a unos 1200 rpm durante 10 minutos para concentrar las células.
2. 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 sanguínea, 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).
3. Incubar los cultivos sin perturbaciones a 37 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO<sub>2</sub>.
4. 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.
5. 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 sanguíneas, los cultivos pueden requerir cambios más frecuentes de los medios.
6. 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 CO<sub>2</sub> durante unos 30 minutos.

Uso del CHANG Amnio para la disección de vellosidades coriónicas:

1. Obtener una placa de Petri de 100 mm X 15 mm dividida en 2 porciones y una placa de Petri de 60 mm X 15 mm. Dispensar 2 ml de los medios (sin suero) en la placa de Petri más pequeña. Dispensar 4 ml de los medios en una porción de la placa de Petri grande y 6 ml de los medios en la otra porción de esa misma placa.
2. Aspirar con cuidado los medios y las vellosidades del tubo de centrifuga original que contiene la muestra de la paciente. Dispensar el medio y las vellosidades en la porción de la placa de Petri más grande con 4 ml de los medios de aspiración.
3. Con un microscopio invertido y dos pinzas estériles, extraer los coágulos de sangre y cualquier decidua materna presente en el exterior de las vellosidades coriónicas. Procurar no dañar las vellosidades frágiles. Transferir las vellosidades limpias a la porción con 6 ml de la placa de Petri más grande.
4. Realizar una limpieza final, utilizando pinzas para agarrar las vellosidades y agitar con suavidad mientras se sumergen en los medios para eliminar la decidua sobrante, los coágulos de sangre o los detritos. Seleccionar vellosidades con ramificaciones y venas visibles, si es posible. Determine la cantidad presente de vellosidades para preparar el número óptimo de cultivos (5 mg es la cantidad ideal por cultivo; no colocar más de 20 mg de vellosidades).
5. Con las pinzas colocar las vellosidades limpias en una placa de Petri más pequeña con 2 ml de medio (sin suero) y luego transferir las vellosidades y los medios a un tubo de centrifuga de 15 ml.

Uso del CHANG Amnio para cultivos primarios de vellosidades coriónicas

1. Añadir 4 gotas de antibiótico (es decir, sulfato de gentamicina, 50 µg/ml) al tubo de centrifuga y dejar en reposo durante 30 minutos.
2. Centrifugar las vellosidades a unos 1400 rpm durante 5 minutos.
3. Aspirar el sobrenadante del tubo de centrifuga, dejando aproximadamente 0,5 ml de los medios por encima del sedimento celular (o aproximadamente 2 veces el volumen de sedimento).
4. Resuspender con suavidad el sedimento. Añadir 2 ml de los medios CHANG Amnio al tubo de centrifuga.
5. Repita los pasos 2-3. Añadir 2 ml de tripsina e incubar el cultivo sin perturbaciones a 37 °C, en una atmósfera con 5-8 % de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos. Sacar el tubo de la incubadora, resuspender el sedimento e introducirlo en la incubadora durante 10 minutos más.
6. Sacar el tubo de centrifuga de la incubadora, resuspender el sedimento y centrifugar durante 8-10 minutos a 1400 rpm.
7. 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.
8. Sacar de la incubadora y realizar una inspección visual para comprobar si el sedimento está turbio y no se visualizan fragmentos nítidos de vellosidades. Si el sedimento no está turbio, introducirlo de nuevo en la incubadora durante 5 minutos.
9. Repetir el paso 8 hasta que el sedimento esté turbio.

Añadir 3 ml del CHANG Amnio al tubo de centrifuga para detener la acción de la colagenasa.

10. Centrifugar los tubos durante 8-10 minutos a 1400 rpm.
11. Aspirar el sobrenadante del tubo de centrifuga, dejando aproximadamente 0,5 ml de los medios por encima del sedimento celular (o aproximadamente 2 veces el volumen de sedimento). Resuspender el sedimento antes de añadir el CHANG Amnio utilizado para la preparación.
12. Preparar un número óptimo de cultivos (aproximadamente 1 cultivo por cada 5 mg de vellosidades utilizadas) utilizando 0,5 ml del CHANG Amnio por cultivo para cada placa de Petri que contenga un cubreobjetos.
13. Incubar los cultivos sin perturbaciones a 37 °C en una atmósfera con 5-8 % de CO<sub>2</sub>.
14. Inundar los cultivos el día 2 añadiendo 1,5 ml de CHANG Amnio.
15. 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 a cada cubreobjetos. Los cultivos se deben alimentar cada 2 días a partir de entonces. En caso de muestras sanguíneas, los cultivos pueden requerir cambios más frecuentes de los medios.
16. Comprobar el crecimiento de los cultivos el día 5 y cosecharlos cuando se observen suficientes colonias.
17. 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 incluyan el uso previsto del producto. No usar frascos en los que el envase 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 :

1. La culture primaire des cellules du liquide amniotique ;
2. Le repiquage des cellules du liquide amniotique ;
3. La culture des tissus des prélèvements de villosités chorales de la membrane amniotique.

Ce milieu a été conçu pour être utilisé dans les étuves à CO<sub>2</sub> (cultures équilibrées dans une atmosphère contenant 5 à 8 % de CO<sub>2</sub>).

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 chorales 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

<b>Tampons</b>	<b>Protéines, hormones et facteurs de croissance</b>	Phosphate de potassium
Bicarbonate de sodium	Sérum de veau fœtal (SVF)	Sulfate de magnésium
<b>Antioxydant</b>	Sérum de veau fœtal (SVF)	Phosphate de sodium
Acide thiocétique	Sérum de veau naissant	<b>Acides nucléiques</b>
<b>Antibiotique</b>	Transferrine humaine	Désoxyadénosine
Sulfate de gentamicine	Facteur de croissance des fibroblastes	Désoxycytidine
<b>Acides aminés</b>	Alanine	Désoxyguanosine
Alanine	Arginine	Adénosine
Arginine	Asparagine	Cytidine
Asparagine	Acide aspartique	Guanosine
Acide aspartique	Cystéine	Thymidine
Cystéine	Acide glutamique	Uridine
Acide glutamique	Glutamine	<b>Autre</b>
Glutamine	Glycine	Alcool éthylique
Glycine	Histidine	Thyronine
Histidine	Isoleucine	<b>Vitamines et oligo-éléments</b>
Isoleucine	Leucine	Acide ascorbique
Leucine	Lysine	Acide folique
Lysine	Méthionine	Glucose
Méthionine	Phénylalanine	Nicotinamide
Phénylalanine	Proline	Riboflavine
Proline	Sérine	Thiamine
Sérine	Thréonine	Acide
Thréonine	Tryptophane	pantothénique
Tryptophane	Tyrosine	Cobalamine
Tyrosine	Valine	Pyridoxine
Valine		Biotine
		<b>Eau</b>
		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 rapidement en agitant le flacon dans un bain-marie à 37 °C.

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

#### PRÉPARATION D'ALIKOTES 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 tr/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 en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %).
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 tr/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 en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %).
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 jaunâtre-saumon). Le pH peut facilement être ajusté en plaçant le tube du milieu dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5 à 8 %), le bouchon légèrement dévissé pendant environ 30 minutes.

Utilisation de CHANG Amnio pour la dissection des prélèvements de villosités chorales :

1. Se procurer une boîte de Pétri de 100 mm x 15 mm, divisée en deux compartiments, et une boîte de Pétri de 60 mm x 15 mm. Répartir 2 ml du milieu (sans sérum) dans la boîte de Pétri la plus petite. Répartir 4 ml du milieu dans un compartiment de la boîte de Pétri la plus grande et 6 ml du milieu dans l'autre compartiment de la même boîte.
2. Aspirer délicatement le milieu et les villosités du tube à centrifuger initial contenant l'échantillon de la patiente. Répartir le milieu et les villosités dans le compartiment de la boîte de Pétri la plus grande avec 4 ml de milieu d'aspiration.
3. À l'aide d'un microscope à statif inversé et de deux pinces stériles, prélever les caillots sanguins et toute caduque maternelle présents à l'extérieur des villosités chorales. Éviter d'endommager les villosités fragiles. Transférer les villosités propres dans le compartiment de 6 ml de la boîte de Pétri la plus grande.
4. Effectuer un nettoyage final en utilisant une pince pour saisir les villosités et les agiter légèrement lorsqu'elles sont immergées dans le milieu pour retirer toute caduque, tout caillot sanguin ou tout débris excédentaires. Choisir des villosités présentant des branches et des veines visibles, si possible. Déterminer la quantité de villosités présentes pour préparer le nombre optimal de cultures (5 mg est la quantité idéale à utiliser par culture ; ne pas préparer plus de 20 mg de villosités).
5. Placer les villosités propres dans la petite boîte de Pétri avec 2 ml de milieu (sans sérum) à l'aide d'une pince, puis transférer les villosités et le milieu dans un tube à centrifuger de 15 ml.

Utilisation de CHANG Amnio pour les cultures primaires des prélèvements de villosités chorales

1. Ajouter 4 gouttes d'antibiotique (c.-à-d. sulfate de gentamicine, 50 µg/ml) au tube à centrifuger et laisser reposer pendant 30 minutes.
2. Centrifuger les villosités à environ 1 400 tr/min pendant 5 minutes.
3. Aspirer le surnageant du tube centrifugé, en laissant environ 0,5 ml de milieu au-dessus du culot de cellules (ou environ deux fois le volume du culot).
4. Remettre délicatement le culot en suspension. Ajouter 2 ml de CHANG Amnio au tube à centrifuger.
5. Répéter les étapes 2 et 3. Ajouter 2 ml de trypsine et incuber la culture sans agitation à 37 °C en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %) pendant 10 minutes. Sortir le tube de l'étuve, remettre le culot en suspension et le placer dans l'étuve pendant 10 minutes supplémentaires.
6. Sortir le tube à centrifuger de l'étuve, remettre le culot en suspension et centrifuger pendant 8 à 10 minutes à 1 400 tr/min.
7. 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.
8. Le sortir de l'étuve 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'étuve pendant 5 minutes.
9. Répéter l'étape 8 jusqu'à ce que le culot soit trouble. Ajouter 3 ml de CHANG Amnio au tube à centrifuger

pour arrêter l'action de la collagénase.

10. Centrifuger le tube pendant 8 à 10 minutes à 1 400 tr/min.
11. Aspirer le surnageant du tube centrifugé, en laissant environ 0,5 ml de milieu au-dessus du culot de cellules (ou environ deux fois le volume du culot). Remettre le culot en suspension avant d'ajouter CHANG Amnio utilisé pour la préparation.
12. Préparer le nombre optimal de cultures (environ une culture pour 5 mg de villosités) en utilisant 0,5 ml de CHANG Amnio par culture pour chaque boîte de Pétri contenant une lamelle.
13. Incuber les cultures sans agitation à 37 °C en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %).
14. Inonder les cultures le deuxième jour en ajoutant 1,5 ml de CHANG Amnio.
15. Au bout de 4 jours, vérifier la croissance des cultures. Si une croissance est observée, prélever le milieu et ajouter 2 ml de CHANG Amnio 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.
16. Vérifier la croissance des cultures le cinquième jour et procéder à la collecte lorsque les cultures ont des colonies de taille suffisante.
17. 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 de procréation médicalement assistée comprenant l'application indiquée pour laquelle le dispositif est prévu. Ne pas utiliser de flacon dont la stérilité de l'emballage a été compromise. 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 CO<sub>2</sub> (culturas equilibradas com atmosfera de 5%–8% de CO<sub>2</sub>).

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

<b>Tampões</b> Bicarbonato de sódio	<b>Proteínas, hormonas e fatores de crescimento</b> Soro bovino fetal neonatal Soro bovino humano Transferrina humana Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)	Sulfato de magnésio Fosfato de sódio
<b>Antioxidante</b> Ácido tiótico	(FBS)	<b>Ácidos nucleicos</b> Desoxiadenosina Desoxicitidina Desoxiguanosina
<b>Antibiótico</b> Sulfato de gentamicina	Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)	Adenosina Citidina Guanosina Timidina Uridina
<b>Aminoácido</b> Alanina Arginina Asparagina Ácido aspártico Cisteína Ácido glutâmico Glutamina Glicina Histidina Isoleucina Leucina Lisina Metionina Fenilalanina Prolina Serina Treonina Triptofano Tirosina Valina	<b>Indicador de pH</b> Vermelho de fenol	<b>Outro</b> Alcool etílico Tironina
	<b>Substratos energéticos</b> Glucose Piruvato Inositol	<b>Vitaminas e oligoelementos</b> Ácido ascórbico Ácido fólico Nicotinamida Riboflavina Tiamina Ácido pantoténico Cobalamina Pirridoxina Biotina
	<b>Sais e iões</b> Cloreto de sódio Selenito de sódio Cloreto de cálcio Cloreto de colina Cloreto de potássio Fosfato de potássio	<b>Água</b> 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 rapidamente, girando o frasco em banho-maria a 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 do CHANG Amnio para culturas primárias: Metodologias *in situ*

1. Centrifuge 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, necessário 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 CO<sub>2</sub>.
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. Centrifuge 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, necessário 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 CO<sub>2</sub>.
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 CO<sub>2</sub> com a tampa ligeiramente desaperçada durante cerca de 30 minutos.

Utilização do CHANG Amnio para disseção de CVS:

1. Obtenha uma placa de Petri de 100 mm X 15 mm dividida em 2 partes e uma placa de Petri de 60 mm X 15 mm. Dispense 2 ml de meio (sem soro) na placa de Petri mais pequena. Dispense 4 ml do meio numa das partes da placa de Petri grande e 6 ml de meio na outra parte da mesma placa.
2. Aspire cuidadosamente o meio e as vilosidades do tubo de centrifugadora original que contém a amostra do doente. Dispense o meio e as vilosidades na parte da placa de Petri maior com 4 ml de meio aspirado.
3. Utilizando um microscópio de inversão e duas pinças estéreis, retire os coágulos sanguíneos e qualquer decídua materna presente do exterior das vilosidades coriônicas. Tenha cuidado para evitar danificar as vilosidades frágeis. Transfira as vilosidades limpas para a parte de 6 ml da placa de Petri maior.
4. Efetue uma limpeza final, utilizando a pinça para segurar as vilosidades e agitá-las suavemente enquanto mergulhadas no meio para remover qualquer excedente de decídua, coágulos sanguíneos ou detritos. Escolha vilosidades com ramos e veias visíveis, se possível. Determine a quantidade de vilosidades presente para preparar o número de culturas ideal (5 mg é a quantidade ideal a utilizar por cultura, não prepare mais de 20 mg de vilosidades).
5. Coloque as vilosidades limpas na placa de Petri mais pequena com 2 ml de meio (sem soro), utilizando uma pinça, e, em seguida, transfira as vilosidades e o meio para um tubo de centrifugadora de 15 ml.

Utilização do CHANG Amnio para culturas primárias de CVS

1. Adicione 4 gotas de antibiótico (ou seja, sulfato de gentamicina, 50 µg/ml) ao tubo de centrifugadoras e deixe repousar durante 30 minutos.
2. Centrifuge as vilosidades a, aproximadamente, 1400 rpm durante 5 minutos.
3. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando 0,5 ml de meio acima do pellet de células (ou cerca de 2x volume do pellet).
4. Ressuspenda suavemente o pellet. Adicione 2 ml de meio CHANG Amnio ao tubo de centrifugadora.
5. Repita os passos 2 a 3. Adicione 2 ml de tripsina e incube a cultura sem interferência a 37 °C, atmosfera de 5%–8% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos. Retire o tubo da incubadora, ressuspenda o pellet e coloque na incubadora durante mais 10 minutos.
6. Retire o tubo de centrifugadora da incubadora, ressuspenda o pellet e centrifugue durante 8 a 10 minutos a 1400 rpm.
7. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado. Ressuspenda o pellet e, em seguida, adicione 1 ml de colagenase ao tubo e coloque na incubadora durante 5 minutos.
8. 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.
9. Repita o passo 8 até o pellet estar turvo. Adicione 3 ml

de CHANG Amnio ao tubo de centrifugadora para parar a ação da colagenase.

10. Centrifugue o tubo durante 8 a 10 minutos a 1400 rpm.
11. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando 0,5 ml de meio acima do pellet de células (ou cerca de 2x volume do pellet). Ressuspenda o pellet antes de adicionar o CHANG Amnio utilizado para preparação.
12. Coloque o número de culturas ideal (aproximadamente 1 cultura por cada 5 mg de vilosidades utilizadas), utilizando 0,5 ml de CHANG Amnio por cultura para cada placa de Petri que contenha uma lamela.
13. Incube as culturas sem interferência a 37 °C numa atmosfera de 5%–8% de CO<sub>2</sub>.
14. Inunde as culturas no 2.º dia, adicionando 1,5 ml de CHANG Amnio.
15. O crescimento das culturas deve ser verificado aos 4 dias. Caso se observe crescimento, retire o meio e adicione 2 ml de CHANG Amnio fresco 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.
16. Verifique o crescimento das culturas no 5.º dia e proceda à colheita de colónias, quando estas forem suficientes.
17. 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.

## ΕΛΛΗΝΙΚΑ

### ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Amnio με γενταμικίνη και L-γλουταμίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις παρακάτω εφαρμογές:

1. την πρωτογενή καλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού
2. την ανάπτυξη κυττάρων υποκαλλιεργείων αμνιακού υγρού
3. τη δειγματοληψία συμπαγούς αμνιακού ιστού από χοριακές λάχνες.

Αυτό το μέσο έχει σχεδιαστεί για χρήση σε επωαστήρες CO<sub>2</sub> (καλλιέργειες εξισορροπημένες με ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub>).

Το τελικό pH πρέπει να είναι 6,65-7,44. Δείτε τις οδηγίες χρήσης.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το CHANG Amnio είναι ένα πλήρες, έτοιμο για χρήση, μέσο για την αρχική καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων αμνιακού υγρού (AFU), δειγματοληψία χοριακών λαχνών (CVS) και προϊόντων σύλληψης (POC) για χρήση στην καριουτοποίηση και άλλες προγεννητικές γενετικές εξετάσεις. Αυτή η σύνθεση έχει βελτιστοποιηθεί τόσο για μεθοδολογίες για μπουκαλάρια όσο και για μεθοδολογίες in situ. Το προϊόν αυτό περιέχει το αντιβιοτικό θειική γενταμικίνη (50 µg/mL)

### ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

<b>Ρυθμιστικά διαλύματα</b> Διπτανθρακικό νάτριο	<b>Πρωτεϊνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες</b> Ορός από έμβρυο βοοειδών (FBS) Ορός από νεογνό βοοειδών Ανθρώπινη τρανσφερίνη Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF) Ινοουλίνη Αργινίνη Ασπαράγινη Ασπαραγικό οξύ Κυστεΐνη Γλουταμικό οξύ Γλουταμίνη Γλυκίνη Ισθιδίνη Ισολευκίνη Λευκίνη Λυσίνη Μεθειονίνη Φαινυλαλανίνη Προλίνη Σερίνη Θρεονίνη Τρυπτοφάνη Τυροσίνη Βαλίνη	Χλωριούχο κάλιο Φωσφορικό κάλιο Θειικό μαγνήσιο Φωσφορικό νάτριο
<b>Αντιοξειδωτικό</b> Θειοκτικό οξύ	<b>Νουκλεϊκά οξέα</b> Δεοξυδεοξισίνη Δεοξυκυτιδίνη Δεοξυγυανοσίνη Αδενοσίνη Κυτιδίνη Γουανοσίνη Θυμιδίνη Ουριδίνη	
<b>Αμινοξέα</b> Αλανίνη Αργινίνη Ασπαράγινη Ασπαραγικό οξύ Κυστεΐνη Γλουταμικό οξύ Γλουταμίνη Γλυκίνη Ισθιδίνη Ισολευκίνη Λευκίνη Λυσίνη Μεθειονίνη Φαινυλαλανίνη Προλίνη Σερίνη Θρεονίνη Τρυπτοφάνη Τυροσίνη Βαλίνη	<b>Άλλα</b> Αιθυλική αλκοόλη Θυρονίνη	
<b>Δείκτες pH</b> Ερυθρό της φαινόλης	<b>Βιταμίνες και ιννοστοιχεία</b> Ασκορβικό οξύ Φυλλικό οξύ Νικοτιναμίδη Ριβοφλαβίνη Θειαμίνη Παντοθενικό οξύ Κοβαλαμίνη Πυριδοξίνη Βιοτίνη	
<b>Ενεργειακά υποστρώματα</b> Γλυκόζη Πυροσταφυλικό ινοσιτόλη	<b>Άλατα και ιόντα</b> Χλωριούχο νάτριο Σεληνικό νάτριο Χλωριούχο ασβέστιο Χλωριούχος χολίνη	<b>Νερό</b> Ποιότητα ενέσιμου ύδατος (WFI)

### ΔΙΑΣΦΑΛΙΞΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

#### ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ

Ο ορός που χρησιμοποιείται στην παραγωγή του CHANG Amnio έχει ελεγχθεί για ιογενή μόλυνση σύμφωνα με το CFR Title 9 Part 113.53. Έχει επίσης εξεταστεί για μόλυνση από μυκόπλασμα. Το CHANG Amnio έχει αποστειρωθεί μέσω διήθησης με φίλτρο 0,1 μικρομέτρων. Δείγματα του CHANG Amnio ελέγχονται για πιθανή βακτηριολογική μόλυνση, ακολουθώντας το πρωτόκολλο δοκιμασίας στεριότητας που περιγράφεται στην τρέχουσα δοκιμασία στεριότητας κατά USP <71>.

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

Αποψύξτε γρήγορα, περιδινίζοντας τη φιάλη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C.

Το CHANG Amnio περιέχει γενταμικίνη (50 mg/L). Μπορείτε να προσθέσετε συμπληρωματικά αντιβιοτικά αν το επιθυμείτε.

### ΔΙΑΜΟΙΡΑΣΜΟΣ ΤΟΥ CHANG Amnio ΣΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ

1. Αποψύξτε το CHANG Amnio σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες.

2. Διανείμετε, υπό άσηπτες συνθήκες, σε πρακτικό μέγεθος κλάσματα και καταψύξτε τα ξανά.
3. Αποψύξτε τα κλάσματα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C όταν είστε έτοιμοι να τα χρησιμοποιήσετε.

### ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Χρήση του CHANG Amnio για πρωτογενείς καλλιέργειες: *in situ* μεθοδολογίες

1. Φυγοκεντρίστε το αμνιακό υγρό, σε ταχύτητα 1.200 σ.α.λ. περίπου για 10 λεπτά, για συμπύκνωση των κυττάρων.
2. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος) του φυγοκεντρισμένου αμνιακού υγρού. Διαμοιράστε σε κλάσματα το υπερκείμενο υγρό (τουλάχιστον 1 mL, εάν είναι δυνατόν) για τους προσδιορισμούς α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP) και ακετυλοχολινεστεράσης, εάν είναι απαραίτητο. Εάν το δείγμα είναι αιματηρό, παρασκευάστε ένα πρόσθετο κλάσμα για περαιτέρω έλεγχο. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος σε μικρό όγκο αμνιακού υγρού της ίδιας της ασθένειας. Προσθέστε επαρκή ποσότητα CHANG Amnio στο συμπυκνωμένο κυτταρικό εναιώρημα για να παρασχεθεί τελικός όγκος επίστρωσης 0,5 mL ανά καλυπτρίδα (συνολικά 4 καλυπτρίδες, ανάλογα με το μέγεθος του κυτταρικού συσσωματώματος) ή 2 mL ανά μπουκαλάκι. Εάν το δείγμα ληφθεί από μια ασθενή που βρίσκεται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης, το συσσωμάτωμα μπορεί να είναι μεγαλύτερο, αλλά να περιέχει λιγότερα βιώσιμα κύτταρα, συνενώς να απαιτεί πιο έντονη εμφύτευση (μικρότερη ποσότητα μέσου από τη φυσιολογική).
3. Επωάστε τις καλλιέργειες αδιατάρακτες σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C.
4. Γεμίστε τις καλλιέργειες τη 2η ημέρα, προσθέτοντας 2 mL CHANG Amnio.
5. Μετά από 4 έως 5 ημέρες, οι καλλιέργειες θα πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξή τους. Η παροχή θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες θα πρέπει να γίνεται αφού παρατηρηθεί ανάπτυξη. Παρέχετε θρεπτικό υλικό στις καλλιέργειες αφαιρώντας ολόκληρη την ποσότητα του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας και αντικαθιστώντας το με 2 mL φρέσκου CHANG Amnio. Συνιστάται η παροχή θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες κάθε 2 ημέρες από αυτό το σημείο και έπειτα. Για αιματηρά δείγματα, οι καλλιέργειες μπορεί να χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές μέσου.
6. Ελέγξτε την ανάπτυξη των καλλιεργείων την 5η ημέρα, ή μετά από αυτήν, και συλλέξτε όταν παρατηρηθούν επαρκείς αποικίες.
7. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν οι καλλιέργειες τρέφονται με CHANG Amnio την ημέρα πριν από τη συλλογή.

Χρήση του CHANG Amnio για πρωτογενείς καλλιέργειες: Μεθοδολογίες με μπουκαλάκια

1. Φυγοκεντρίστε το αμνιακό υγρό, σε ταχύτητα 1.200 σ.α.λ. περίπου για 10 λεπτά, για συμπύκνωση των κυττάρων.
2. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος) του φυγοκεντρισμένου αμνιακού υγρού. Διαμοιράστε σε κλάσματα το υπερκείμενο υγρό (τουλάχιστον 1 mL, εάν είναι δυνατόν) για τους προσδιορισμούς α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP) και ακετυλοχολινεστεράσης, εάν είναι απαραίτητο. Εάν το δείγμα είναι αιματηρό, παρασκευάστε ένα πρόσθετο κλάσμα για περαιτέρω έλεγχο. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος σε μικρό όγκο αμνιακού υγρού της ίδιας της ασθένειας. Προσθέστε 4 mL CHANG Amnio για συνολικό όγκο 5 mL ανά μπουκαλάκι. Εάν το δείγμα ληφθεί από μια ασθενή που βρίσκεται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης, το συσσωμάτωμα μπορεί να είναι μεγαλύτερο, αλλά να περιέχει λιγότερα βιώσιμα κύτταρα, συνενώς να απαιτεί πιο έντονη εμφύτευση (μικρότερη ποσότητα

- μέσου από τη φυσιολογική).
3. Επωάστε τις καλλιέργειες αδιατάρακτες σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C.
4. Ελέγξτε την ανάπτυξη την ημέρα 5. Αλλάξτε το μέσο με 2 mL φρέσκου CHANG Amnio και συλλέξτε εάν παρατηρηθεί επαρκής κυτταρική ανάπτυξη.
5. Ελέγξτε την ανάπτυξη των καλλιεργείων και αλλάξτε πλήρως το μέσο καθημερινά, έως ότου παρατηρηθούν επαρκείς αποικίες και είναι έτοιμες για συλλογή. Για αιματηρά δείγματα, οι καλλιέργειες μπορεί να χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές μέσου.
6. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν οι καλλιέργειες τρέφονται με CHANG Amnio την ημέρα πριν από τη συλλογή.

Χρήση του CHANG Amnio για την ανάπτυξη κυττάρων υποκαλλιεργείων αμνιακού υγρού:

Για την υποκαλλιέργεια των κυττάρων, επεξεργαστείτε τις καλλιέργειες με θρυψίνη (ή προνόση κ.λπ.) όπως θα κάνατε εάν τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε συμβατικό μέσο. Ωστόσο, η επεξεργασία με πρωτεάση θα πρέπει να παρακολουθείται προσεκτικά. Τα κύτταρα αμνιακού υγρού που καλλιεργούνται στο CHANG Amnio τείνουν να είναι περισσότερο ευαίσθητα στην επεξεργασία με πρωτεάση από ' ό,τι όταν καλλιεργούνται σε συμβατικά μέσα. Μπορεί να χρειαστεί να τροποποιήσετε το πρωτόκολλό σας για να λάβετε υπόψη αυτή την πληροφορία. Σημείωση: Το pH του μέσου που χρησιμοποιείται για τη θρέψη των καλλιεργείων πρέπει να είναι 6,65-7,44 (δηλαδή το μέσο πρέπει να έχει ελαφρώς κίτρινο χρώμα σοκολάτα). Το pH μπορεί να ρυθμιστεί εύκολα, τοποθετώντας το μέσο σε επωαστήρα 5%-8% CO<sub>2</sub> με το πώμα ελαφρώς χαλαρό για περίπου 30 λεπτά.

Χρήση του CHANG Amnio για διαχωρισμό CVS:

1. Λάβετε ένα τρυβλίο Petri 100 mm X 15 mm διαχωρισμένο σε 2 τμήματα και ένα τρυβλίο Petri 60 mm X 15 mm. Διανείμετε 2 mL του μέσου (χωρίς ορό) στο μικρότερο τρυβλίο Petri. Διανείμετε 4 mL του μέσου σε ένα τμήμα του μεγάλου τρυβλίου Petri και 6 mL του μέσου στο άλλο τμήμα του ίδιου τρυβλίου.
  2. Αναρροφήστε προσεκτικά τα μέσα και τις λάχνες από το αρχικό σωληνάριο φυγοκέντρου που περιέχει το δείγμα του ασθενούς. Διανείμετε τα μέσα και τις λάχνες στο τμήμα του μεγαλύτερου τρυβλίου Petri με 4 mL του μέσου αναρρόφησης.
  3. Χρησιμοποιώντας ανεστραμμένο μικροσκόπιο και δύο αποστειρωμένες λαβίδες, αφαιρέστε τα πήγματα αίματος και τυχόν μητρικό φθαστό που μπορεί να υπάρχουν από το εξωτερικό των χοριακών λαχνών. Προσέξτε ώστε να αποφύγετε τυχόν πρόκληση βλάβης στις εύθραυστες λάχνες. Μεταφέρετε τις καθαρισμένες λάχνες στο τμήμα των 6 mL του μεγαλύτερου τρυβλίου Petri.
  4. Πραγματοποιήστε τελικό καθαρισμό, χρησιμοποιώντας λαβίδα για να πιιάσετε τις λάχνες και ανakinήστε με ήπιες κινήσεις, ενόσω είναι εμβαπτισμένο στο μέσο για να αφαιρέσετε τυχόν περισσεια φθαρτού, πηγμάτων αίματος ή υπολείμματα. Επιλέξτε λάχνες με ορατούς κλάδους και φλέβες, εάν είναι δυνατόν. Προσδιορίστε την ποσότητα των λαχνών που υπάρχουν για την παρασκευή του βέλτιστου αριθμού καλλιεργείων (το 5 mg είναι η ιδανική ποσότητα για χρήση ανά καλλιέργεια. Μη χρησιμοποιείτε πάνω από 20 mg λαχνών για την παρασκευή).
  5. Τοποθετήστε τις καθαρισμένες λάχνες στο μικρότερο τρυβλίο Petri με 2 mL μέσου (χωρίς ορό) χρησιμοποιώντας λαβίδα και κατόπιν μεταφέρετε τις λάχνες και το μέσο σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρου των 15 mL.
- Χρήση του CHANG Amnio για πρωτογενείς καλλιέργειες της CVS
1. Προσθέστε 4 σταγόνες του αντιβιοτικού (δηλαδή θειική γενταμικίνη, 50 µg/mL) στο σωληνάριο φυγοκέντρου και αφήστε το για 30 λεπτά.
  2. Φυγοκεντρίστε τις λάχνες στα 1.400 σ.α.λ. περίπου για 5 λεπτά.
  3. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL μέσου πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος).

4. Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος με ήπιες κινήσεις. Προσθέστε 2 mL του μέσου CHANG Amnio στο σωληνάριο φυγοκέντρου.
5. Επαναλάβετε τα βήματα 2-3. Προσθέστε 2 mL θρυψίνης και επώαστε την καλλιέργεια αδιατάρακτη σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C, για 10 λεπτά. Αφαιρέστε το σωληνάριο από τον επωαστήρα, επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος και τοποθετήστε το σε επωαστήρα για 10 ακόμη λεπτά.
6. Αφαιρέστε το σωληνάριο φυγοκέντρου από τον επωαστήρα, επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος και φυγοκεντρίστε για 8-10 λεπτά στις 1.400 σ.α.λ.
7. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο. Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος, κατόπιν προσθέστε 1 mL κολλαγενόσης στο σωληνάριο και τοποθετήστε σε επωαστήρα για 5 λεπτά.
8. Αφαιρέστε από τον επωαστήρα και επιθεωρήστε οπτικά για να δείτε εάν το συσσωμάτωμα είναι θελωρό και δεν μπορούν να παρατηρηθούν διακριτά μεμονωμένα τμήματα λαχνών. Εάν το συσσωμάτωμα δεν είναι θελωρό, επανατοποθετήστε στον επωαστήρα για 5 λεπτά.
9. Επαναλάβετε το βήμα 8 μέχρι να γίνει θελωρό το συσσωμάτωμα. Προσθέστε 3 mL του CHANG Amnio στο σωληνάριο φυγοκέντρου για τη διακοπή της δράσης της κολλαγενόσης.
10. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο για 8-10 λεπτά στις 1.400 σ.α.λ.
11. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL μέσου πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος). Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος προτού προσθέσετε το CHANG Amnio που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των καλλιεργείων.
12. Παρασκευάστε τον βέλτιστο αριθμό καλλιεργείων (περίπου 1 καλλιέργεια ανά κάθε 5 mg λαχνών που χρησιμοποιούνται) χρησιμοποιώντας 0,5 mL του CHANG Amnio ανά καλλιέργεια, για κάθε τρυβλίο Petri που περιέχει μια καλυπτρίδα.
13. Επωάστε τις καλλιέργειες αδιατάρακτες σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C.
14. Γεμίστε τις καλλιέργειες τη 2η ημέρα, προσθέτοντας 1,5 mL CHANG Amnio.
15. Μετά από 4 ημέρες, οι καλλιέργειες θα πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξή τους. Εάν παρατηρηθεί ανάπτυξη, αφαιρέστε τα μέσα και προσθέστε 2 mL φρέσκου CHANG Amnio σε κάθε καλυπτρίδα. Η θρέψη των καλλιεργείων θα πρέπει να γίνεται κάθε 2 ημέρες από αυτό το σημείο και έπειτα. Για αιματηρά δείγματα, οι καλλιέργειες μπορεί να χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές μέσου.
16. Ελέγξτε την ανάπτυξη των καλλιεργείων την 5η ημέρα και συλλέξτε όταν παρατηρηθούν επαρκείς αποικίες.
17. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν οι καλλιέργειες τρέφονται με CHANG Amnio την ημέρα πριν από τη συλλογή.

### ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Φυλάσσετε κατεψυγμένο κάτω από τους -10 °C. Το προϊόν είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης, όταν φυλάσσεται κατεψυγμένο. Το μη χρησιμοποιημένο προϊόν μπορεί να διανεμηθεί σε κλάσματα εργασίας και να επανακαταψυχθεί για επακόλουθη χρήση ή να πυμαιστεί σφικτά και να φυλαχθεί στους 2 °C έως 8 °C, για έως και 30 ημέρες. Μπορεί να καταψυχθεί το μέγιστο δύο φορές. Προσταψίψτε το από φθορίζον φως.

### ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η συσκευη αυτή προορίζεται για χρήση από προσωπικό που έχει εκπαιδευτεί σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν την υποδεικνυόμενη εφαρμογή για την οποία προορίζεται η συσκευή. Μη χρησιμοποιείτε καμία φιάλη στην οποία έχει παραβιαστεί η ακεραιότητα της αποστειρωμένης συσκευασίας. Μη χρησιμοποιείτε το CHANG Amnio μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που υποδεικνύεται στην ετικέτα.

## FRANÇAIS

### INDICATION D'UTILISATION

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

1. La culture primaire des cellules du liquide amniotique ;
2. Le repiquage des cellules du liquide amniotique ;
3. La culture des tissus des prélèvements de villosités chorales de la membrane amniotique.

Ce milieu a été conçu pour être utilisé dans les étuves à CO<sub>2</sub> (cultures équilibrées dans une atmosphère contenant 5 à 8 % de CO<sub>2</sub>).

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 chorales et des produits de conception lors du caryotype 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

<b>Tampons</b> Bicarbonate de sodium	<b>Protéines, hormones et facteurs de croissance</b> Sérum de veau fœtal (SVF) Sérum de veau naissant Transferrine humaine Facteur de croissance des fibroblastes Alanine Arginine Asparagine Acide aspartique Cystéine Acide glutamique Glutamine Glycine Histidine Isoleucine Leucine Lysine Méthionine Phénylalanine Proline Sérine Thréonine Tryptophane Tyrosine Valine	Phosphate de potassium Sulfate de magnésium Phosphate de sodium <b>Acides nucléiques</b> Désoxyadénosine Désoxycytidine Désoxyguanosine Adénosine Cytidine Guanosine Thymidine Uridine <b>Autre</b> Alcool éthylique Thyrosine <b>Vitamines et oligo-éléments</b> Acide ascorbique Acide folique Nicotinamide Riboflavine Thiamine Acide pantothénique Cobalamine Pyridoxine Biotine <b>Eau</b> Qualité WFI
<b>Antioxydant</b> Acide thiocétique	Sérum de veau fœtal (SVF)	
<b>Antibiotique</b> Sulfate de gentamicine		
<b>Indicateur de pH</b> Rouge de phénol		
<b>Substrats énergétiques</b> Glucose Pyruvate Inositol		
<b>Sels et ions</b> Chlorure de sodium Sélénite de sodium Chlorure de calcium Chlorure de choline Chlorure de potassium		

### 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 rapidement en agitant 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 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 tr/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 en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %).
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 tr/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 en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %).
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 trypsin (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 le 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 jaunâtre-saumon). Le pH peut facilement être ajusté en plaçant le tube du milieu dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5 à 8 %), le bouchon légèrement dévissé pendant environ 30 minutes.

Utilisation de CHANG Amnio pour la dissection des prélèvements de villosités chorales :

1. Se procurer une boîte de Pétri de 100 mm x 15 mm, divisée en deux compartiments, et une boîte de Pétri de 60 mm x 15 mm. Répartir 2 ml du milieu (sans sérum) dans la boîte de Pétri la plus petite. Répartir 4 ml du milieu dans un compartiment de la boîte de Pétri la plus grande et 6 ml du milieu dans l'autre compartiment de la même boîte.
2. Aspirer délicatement le milieu et les villosités du tube à centrifuger initial contenant l'échantillon de la patiente. Répartir le milieu et les villosités dans le compartiment de la boîte de Pétri la plus grande avec 4 ml de milieu d'aspiration.
3. À l'aide d'un microscope à statif inversé et de deux pinces stériles, prélever les caillots sanguins et toute caduque maternelle présents à l'extérieur des villosités chorales. Éviter d'endommager les villosités fragiles. Transférer les villosités propres dans le compartiment de 6 ml de la boîte de Pétri la plus grande.
4. Effectuer un nettoyage final en utilisant une pince pour saisir les villosités et les agiter légèrement lorsqu'elles sont immergées dans le milieu pour retirer toute caduque, tout caillot sanguin ou tout débris excédentaires. Choisir des villosités présentant des branches et des veines visibles, si possible. Déterminer la quantité de villosités présentes pour préparer le nombre optimal de cultures (5 mg est la quantité idéale à utiliser par culture ; ne pas préparer plus de 20 mg de villosités).
5. Placer les villosités propres dans la petite boîte de Pétri avec 2 ml de milieu (sans sérum) à l'aide d'une pince, puis transférer les villosités et le milieu dans un tube à centrifuger de 15 ml.

Utilisation de CHANG Amnio pour les cultures primaires des prélèvements de villosités chorales

1. Ajouter 4 gouttes d'antibiotique (c.-à-d. sulfate de gentamicine, 50 µg/ml) au tube à centrifuger et laisser reposer pendant 30 minutes.
2. Centrifuger les villosités à environ 1 400 tr/min pendant 5 minutes.
3. Aspirer le surnageant du tube centrifugé, en laissant environ 0,5 ml de milieu au-dessus du culot de cellules (ou environ deux fois le volume du culot).
4. Remettre délicatement le culot en suspension. Ajouter 2 ml de CHANG Amnio au tube à centrifuger.
5. Répéter les étapes 2 et 3. Ajouter 2 ml de trypsin et incuber la culture sans agitation à 37 °C en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %) pendant 10 minutes. Sortir le tube de l'étuve, remettre le culot en suspension et le placer dans l'étuve pendant 10 minutes supplémentaires.
6. Sortir le tube à centrifuger de l'étuve, remettre le culot en suspension et centrifuger pendant 8 à 10 minutes à 1 400 tr/min.
7. 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.
8. Le sortir de l'étuve 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'étuve pendant 5 minutes.
9. Répéter l'étape 8 jusqu'à ce que le culot soit trouble. Ajouter 3 ml de CHANG Amnio au tube à centrifuger

pour arrêter l'action de la collagénase.

10. Centrifuger le tube pendant 8 à 10 minutes à 1 400 tr/min.
11. Aspirer le surnageant du tube centrifugé, en laissant environ 0,5 ml de milieu au-dessus du culot de cellules (ou environ deux fois le volume du culot). Remettre le culot en suspension avant d'ajouter CHANG Amnio utilisé pour la préparation.
12. Préparer le nombre optimal de cultures (environ une culture pour 5 mg de villosités) en utilisant 0,5 ml de CHANG Amnio par culture pour chaque boîte de Pétri contenant une lamelle.
13. Incuber les cultures sans agitation à 37 °C en atmosphère de CO<sub>2</sub> (5 à 8 %).
14. Inonder les cultures le deuxième jour en ajoutant 1,5 ml de CHANG Amnio.
15. Au bout de 4 jours, vérifier la croissance des cultures. Si une croissance est observée, prélever le milieu et ajouter 2 ml de CHANG Amnio 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.
16. Vérifier la croissance des cultures le cinquième jour et procéder à la collecte lorsque les cultures ont des colonies de taille suffisante.
17. 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 de procréation médicalement assistée comprenant l'application indiquée pour laquelle le dispositif est prévu.

Ne pas utiliser de flacon dont la stérilité de l'emballage a été compromise.

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 CO<sub>2</sub> (culturas equilibradas com atmosfera de 5%–8% de CO<sub>2</sub>).

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

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

### 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 rapidamente, girando o frasco em banho-maria a 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 do CHANG Amnio para culturas primárias: Metodologias *in situ*

1. Centrifuge 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, necessário 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 CO<sub>2</sub>.
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. Centrifuge 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, necessário 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 CO<sub>2</sub>.
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 CO<sub>2</sub> com a tampa ligeiramente desaperitada durante cerca de 30 minutos.

Utilização do CHANG Amnio para dissecação de CVS:

1. Obtenha uma placa de Petri de 100 mm X 15 mm dividida em 2 partes e uma placa de Petri de 60 mm X 15 mm. Dispense 2 ml de meio (sem soro) na placa de Petri mais pequena. Dispense 4 ml do meio numa das partes da placa de Petri grande e 6 ml de meio na outra parte da mesma placa.
2. Aspire cuidadosamente o meio e as vilosidades do tubo de centrifugadora original que contém a amostra do doente. Dispense o meio e as vilosidades na parte da placa de Petri maior com 4 ml de meio aspirado.
3. Utilizando um microscópio de inversão e duas pinças estéreis, retire os coágulos sanguíneos e qualquer decídua materna presente do exterior das vilosidades coriônicas. Tenha cuidado para evitar danificar as vilosidades frágeis. Transfira as vilosidades limpas para a parte de 6 ml da placa de Petri maior.
4. Efetue uma limpeza final, utilizando a pinça para segurar as vilosidades e agitá-las suavemente enquanto mergulhadas no meio para remover qualquer excedente de decídua, coágulos sanguíneos ou detritos. Escolha vilosidades com ramos e veias visíveis, se possível. Determine a quantidade de vilosidades presente para preparar o número de culturas ideal (5 mg é a quantidade ideal a utilizar por cultura, não prepare mais de 20 mg de vilosidades).
5. Coloque as vilosidades limpas na placa de Petri mais pequena com 2 ml de meio (sem soro), utilizando uma pinça, e, em seguida, transfira as vilosidades e o meio para um tubo de centrifugadora de 15 ml.

Utilização do CHANG Amnio para culturas primárias de CVS

1. Adicione 4 gotas de antibiótico (ou seja, sulfato de gentamicina, 50 µg/ml) ao tubo de centrifugadoras e deixe repousar durante 30 minutos.
2. Centrifuge as vilosidades a, aproximadamente, 1400 rpm durante 5 minutos.
3. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando 0,5 ml de meio acima do pellet de células (ou cerca de 2x volume do pellet).
4. Ressuspenda suavemente o pellet. Adicione 2 ml de meio CHANG Amnio ao tubo de centrifugadora.
5. Repita os passos 2 a 3. Adicione 2 ml de tripsina e incube a cultura sem interferência a 37 °C, atmosfera de 5%–8% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos. Retire o tubo da incubadora, ressuspenda o pellet e coloque na incubadora durante mais 10 minutos.
6. Retire o tubo de centrifugadora da incubadora, ressuspenda o pellet e centrifuge durante 8 a 10 minutos a 1400 rpm.
7. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado. Ressuspenda o pellet e, em seguida, adicione 1 ml de colagenase ao tubo e coloque na incubadora durante 5 minutos.
8. 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.
9. Repita o passo 8 até o pellet estar turvo. Adicione 3 ml

de CHANG Amnio ao tubo de centrifugadora para parar a ação da colagenase.

10. Centrifuge o tubo durante 8 a 10 minutos a 1400 rpm.
11. Aspire o sobrenadante do tubo centrifugado, deixando 0,5 ml de meio acima do pellet de células (ou cerca de 2x volume do pellet). Ressuspenda o pellet antes de adicionar o CHANG Amnio utilizado para preparação.
12. Coloque o número de culturas ideal (aproximadamente 1 cultura por cada 5 mg de vilosidades utilizadas), utilizando 0,5 ml de CHANG Amnio por cultura para cada placa de Petri que contenha uma lamela.
13. Incube as culturas sem interferência a 37 °C numa atmosfera de 5%–8% de CO<sub>2</sub>.
14. Inunde as culturas no 2.º dia, adicionando 1,5 ml de CHANG Amnio.
15. O crescimento das culturas deve ser verificado aos 4 dias. Caso se observe crescimento, retire o meio e adicione 2 ml de CHANG Amnio fresco 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.
16. Verifique o crescimento das culturas no 5.º dia e proceda à colheita de colónias, quando estas forem suficientes.
17. 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.

## ΕΛΛΗΝΙΚΑ

### ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ

Το CHANG Amnio με νευραμικίνη και L-γλουταμίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις παρακάτω εφαρμογές:

1. την πρωτογενή καλλιέργεια κυττάρων αμνιακού υγρού
2. την ανάπτυξη κυττάρων υποκαλλιεργείων αμνιακού υγρού
3. τη δειγματοληψία συμπαγούς αμνιακού ιστού από χοριακές λάχνες.

Αυτό το μέσο έχει σχεδιαστεί για χρήση σε επωαστήρες CO<sub>2</sub> (καλλιέργειες εξισορροπημένες με ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub>).

Το τελικό pH πρέπει να είναι 6,65-7,44. Δείτε τις οδηγίες χρήσης.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το CHANG Amnio είναι ένα πλήρες, έτοιμο για χρήση, μέσο για την αρχική καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων αμνιακού υγρού (AFC), δειγματοληψία χοριακών λαχνών (CVS) και προϊόντων σύλληψης (POC) για χρήση στην καρυοτυποποίηση και άλλες προγεννητικές γενετικές εξετάσεις. Αυτή η σύνθεση έχει βελτιστοποιηθεί τόσο για μεθοδολογίες για μπουκαλάκια όσο και για μεθοδολογίες in situ. Το προϊόν αυτό περιέχει το αντιβιοτικό θειική γενταμικίνη (50 μg/mL)

### ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

<b>Ρυθμιστικά διαλύματα</b> Διπτανθρακικό νάτριο	<b>Πρωτεΐνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες</b> Ορός από έμβρυο βοοειδών (FBS) Ορός από νεογνό βοοειδών Ανθρώπινη τρανσφερίνη Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF) Ινσουλίνη Αργινίνη Προγεστερόνη Τεστοστερόνη Βήτα οιστραδιόλη Υδροκορτιζόνη	Χλωριούχο κάλιο Φωσφορικό κάλιο Θειικό μαγνήσιο Φωσφορικό νάτριο
<b>Αντιοξειδωτικό</b> Θειοκτικό οξύ	<b>Νουκλεϊκά οξέα</b> Δεοξυαδενοσίνη Δεοξυκυτιδίνη Δεοξυγουανοσίνη Αδενοσίνη Κυτιδίνη Γουανοσίνη Θυμιδίνη Ουριδίνη	<b>Νουκλεϊκά οξέα</b> Δεοξυαδενοσίνη Δεοξυκυτιδίνη Δεοξυγουανοσίνη Αδενοσίνη Κυτιδίνη Γουανοσίνη Θυμιδίνη Ουριδίνη
<b>Αντιβιοτικό</b> Θειική γενταμικίνη	<b>Άλλα</b> Αιθυλική αλκοόλη Ουροβίνη	<b>Άλλα</b> Αιθυλική αλκοόλη Ουροβίνη
<b>Αμινοξύ</b> Αλανίνη Αργινίνη Ασπαράγνη Ασπαραγικό οξύ Κυστεΐνη Γλουταμικό οξύ Γλουταμίνη Γλυκίνη Ιστιδίνη Ισολευκίνη Λευκίνη Λυσίνη Μεθειονίνη Φανυλαλανίνη Προλίνη Σερΐνη Θρεονίνη Τρυπτοφάνη Τυροσίνη Βαλίνη	<b>Δείκτες pH</b> Ερυθρό της φανόλης <b>Ενεργειακά υποστρώματα</b> Γλυκόζη Πυροσταφυλικό ινοσιτόλη <b>Άλατα και ιόντα</b> Χλωριούχο νάτριο Σεληνικό νάτριο Χλωριούχο ασβέστιο Χλωριούχος χολίνη	<b>Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία</b> Ασκορβικό οξύ Φυλλικό οξύ Νικοτινιμίδη Ριβοφλαβίνη Θειαμίνη Πανθοθενικό οξύ Κοβαλαμίνη Πυριδοξίνη Βιοτίνη <b>Νερό</b> Ποιότητα ενέσιμου ύδατος (WFI)

### ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ

Ο ορός που χρησιμοποιείται στην παραγωγή του CHANG Amnio έχει ελεγχθεί για ιογενή μόλυνση σύμφωνα με το CFR Title 9 Part 113.53. Έχει επίσης εξεταστεί για μόλυνση από μυκόπλασμα. Το CHANG Amnio έχει αποστειρωθεί μέσω διήθησης με φίλτρο 0,1 μικρομέτρων. Δείγματα του CHANG Amnio ελέγχονται για πιθανή βακτηριολογική μόλυνση, ακολουθώντας το πρωτόκολλο δοκιμασίας στεριρότητας που περιγράφεται στην τρέχουσα δοκιμασία στεριρότητας κατά USP <71>.

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

Αποψύξτε γρήγορα, περιδινίζοντας τη φιάλη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C.

Το CHANG Amnio περιέχει νευραμικίνη (50 mg/L). Μπορείτε να προσθέσετε συμπληρωματικά αντιβιοτικά αν το επιθυμείτε.

### ΔΙΑΜΟΡΦΑΣΜΟΣ ΤΟΥ CHANG Amnio ΣΕ ΚΛΑΣΜΑΤΑ

1. Αποψύξτε το CHANG Amnio σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες.

2. Διανείμετε, υπό άσηπτη συνθήκες, σε πρακτικό μεγέθους κλάσματα και καταψύξτε τα ξανά.
3. Αποψύξτε τα κλάσματα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C όταν είστε έτοιμοι να τα χρησιμοποιήσετε.

### ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Χρήση του CHANG Amnio για πρωτογενείς καλλιέργειες: *in situ* μεθοδολογίες

1. Φυγοκεντρίστε το αμνιακό υγρό, σε ταχύτητα 1.200 σ.α.λ. περίπου για 10 λεπτά, για συμπύκνωση των κυττάρων.
2. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος) του φυγοκεντρισμένου αμνιακού υγρού. Διαμοιράστε σε κλάσματα το υπερκείμενο υγρό (τουλάχιστον 1 mL, εάν είναι δυνατόν) για τους προσδιορισμούς α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP) και ακετυλοχολινεστεράσης, εάν είναι απαραίτητο. Εάν το δείγμα είναι αιματηρό, παρασκευάστε ένα πρόσθετο κλάσμα για περαιτέρω έλεγχο. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος σε μικρό όγκο αμνιακού υγρού της ίδιας της ασθενούς. Προσθέστε επαρκή ποσότητα CHANG Amnio στο συμπυκνωμένο κυτταρικό εναιώρημα για να παρασχεθεί τελικός όγκος επίστρωσης 0,5 mL ανά καλυπτρίδα (συνολικά 4 καλυπτρίδες, ανάλογα με το μέγεθος του κυτταρικού συσσωματώματος) ή 2 mL ανά μπουκαλάκι. Εάν το δείγμα ληφθεί από μια ασθενή που βρίσκεται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης, το συσσωμάτωμα μπορεί να είναι μεγαλύτερο, αλλά να περιέχει λιγότερα βιώσιμα κύτταρα, συνεπώς να απαιτεί πιο έντονη εμφύτευση (μικρότερη ποσότητα μέσου από τη φυσιολογική).
3. Επωάστε τις καλλιέργειες αδιατάρακτες σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C.
4. Γεμίστε τη καλλιέργεια τη 2η ημέρα, προσθέτοντας 2 mL CHANG Amnio.
5. Μετά από 4 έως 5 ημέρες, οι καλλιέργειες θα πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξή τους. Η παροχή θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες θα πρέπει να γίνεται αφού παρατηρηθεί ανάπτυξη. Παρέχετε θρεπτικό υλικό στις καλλιέργειες αφαιρώντας ολόκληρη την ποσότητα του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας και αντικαθιστώντας το με 2 mL φρέσκου CHANG Amnio. Συνιστάται η παροχή θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες κάθε 2 ημέρες από αυτό το σημείο και έπειτα. Για αιματηρά δείγματα, οι καλλιέργειες μπορεί να χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές μέσου.
6. Ελέγξτε την ανάπτυξη των καλλιεργείων την 5η ημέρα, ή μετά από αυτήν, και συλλέξτε όταν παρατηρηθούν επαρκείς αποικίες.
7. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν οι καλλιέργειες τρέφονται με CHANG Amnio την ημέρα πριν από τη συλλογή.

Χρήση του CHANG Amnio για πρωτογενείς καλλιέργειες: Μεθοδολογίες με μπουκαλάκια

1. Φυγοκεντρίστε το αμνιακό υγρό, σε ταχύτητα 1.200 σ.α.λ. περίπου για 10 λεπτά, για συμπύκνωση των κυττάρων.
2. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος) του φυγοκεντρισμένου αμνιακού υγρού. Διαμοιράστε σε κλάσματα το υπερκείμενο υγρό (τουλάχιστον 1 mL, εάν είναι δυνατόν) για τους προσδιορισμούς α-εμβρυϊκής σφαιρίνης (AFP) και ακετυλοχολινεστεράσης, εάν είναι απαραίτητο. Εάν το δείγμα είναι αιματηρό, παρασκευάστε ένα πρόσθετο κλάσμα για περαιτέρω έλεγχο. Επαναλάβετε την εναιώρηση του κυτταρικού συσσωματώματος σε μικρό όγκο αμνιακού υγρού της ίδιας της ασθενούς. Προσθέστε 4 mL CHANG Amnio για συνολικό όγκο 5 mL ανά μπουκαλάκι. Εάν το δείγμα ληφθεί από μια ασθενή που βρίσκεται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης, το συσσωμάτωμα μπορεί να είναι μεγαλύτερο, αλλά να περιέχει λιγότερα βιώσιμα κύτταρα, συνεπώς να απαιτεί πιο έντονη εμφύτευση (μικρότερη ποσότητα

- μέσου από τη φυσιολογική).
3. Επωάστε τις καλλιέργειες αδιατάρακτες σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C.
4. Ελέγξτε την ανάπτυξη την ημέρα 5. Αλλάξτε το μέσο με 2 mL φρέσκου CHANG Amnio και συλλέξτε εάν παρατηρηθεί επαρκής κυτταρική ανάπτυξη.
5. Ελέγξτε την ανάπτυξη των καλλιεργείων και αλλάξτε πλήρως το μέσο καθημερινά, έως ότου παρατηρηθούν επαρκείς αποικίες και είναι έτοιμες για συλλογή. Για αιματηρά δείγματα, οι καλλιέργειες μπορεί να χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές μέσου.
6. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν οι καλλιέργειες τρέφονται με CHANG Amnio την ημέρα πριν από τη συλλογή.

Χρήση του CHANG Amnio για την ανάπτυξη κυττάρων υποκαλλιεργείων αμνιακού υγρού:

Για την υποκαλλιέργεια των κυττάρων, επεξεργαστείτε τις καλλιέργειες με θρυψίνη (ή προνόση κ.λπ.) όπως θα κάνετε εάν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συμβατικό μέσο. Ωστόσο, η επεξεργασία με πρωτεάση θα πρέπει να παρακολουθείται προσεκτικά. Τα κύτταρα αμνιακού υγρού που καλλιεργούνται στο CHANG Amnio τείνουν να είναι περισσότερο ευαίσθητα στην επεξεργασία με πρωτεάση από ό,τι όταν καλλιεργούνται σε συμβατικά μέσα. Μπορεί να χρειαστεί να τροποποιήσετε το πρωτόκολλό σας για να λάβετε υπόψη αυτή την πληροφορία. Σημείωση: Το pH του μέσου που χρησιμοποιείται για τη θρέψη των καλλιεργείων πρέπει να είναι 6,65-7,44 (δηλαδή το μέσο πρέπει να έχει ελαφρώς κίτρινο χρώμα σολομού). Το pH μπορεί να ρυθμιστεί εύκολα, τοποθετώντας το μέσο σε επωαστήρα 5%-8% CO<sub>2</sub> με το πάμα ελαφρώς χαλαρό για περίπου 30 λεπτά.

Χρήση του CHANG Amnio για διαχωρισμό CVS:

1. Λάβετε ένα τρυβλίο Petri 100 mm X 15 mm διαχωρισμένο σε 2 τμήματα και ένα τρυβλίο Petri 60 mm X 15 mm. Διανείμετε 2 mL του μέσου (χωρίς ορμό) στο μικρότερο τρυβλίο Petri. Διανείμετε 4 mL του μέσου σε ένα τμήμα του μεγάλου τρυβλίου Petri και 6 mL του μέσου στο άλλο τμήμα του ίδιου τρυβλίου.
2. Αναρροφήστε προσεκτικά τα μέσα και τις λάχνες από το αρχικό σωληνάριο φυγοκέντρου που περιέχει το δείγμα του ασθενούς. Διανείμετε τα μέσα και τις λάχνες στο τμήμα του μεγαλύτερου τρυβλίου Petri με 4 mL του μέσου αναρρόφησης.
3. Χρησιμοποιώντας αναστραμμένο μικροσκόπιο και δύο αποστειρωμένες λαβίδες, αφαιρέστε τα πήγματα αίματος και τυχόν μητρικό φθαρτό που μπορεί να υπάρχουν από το εξωτερικό των χοριακών λαχνών. Προσέξτε ώστε να αποφύγετε τυχόν πρόκληση βλάβης στις ευθραυστές λάχνες. Μεταφέρετε τις καθαρισμένες λάχνες στο τμήμα των 6 mL του μεγαλύτερου τρυβλίου Petri.
4. Πραγματοποιήστε τελικό καθαρισμό, χρησιμοποιώντας λάβη και ψιδάστε τις λάχνες και ανακινήστε με ήπιες κινήσεις, ενόσω είναι εμβυθισμένο στο μέσο για να αφαιρέσετε τυχόν περισσίαιμα φθαρτού, πηγμάτων αίματος ή υπολείμματα. Επιλέξτε λάχνες με ορατούς κλάδους και φλέβες, εάν είναι δυνατόν. Προσδιορίστε την ποσότητα των λαχνών που υπάρχουν για την παρασκευή του βέλτιστου αριθμού καλλιεργείων (το 5 mg είναι η ιδανική ποσότητα για χρήση ανά καλλιέργεια. Μη χρησιμοποιείτε πάνω από 20 mg λαχνών για την παρασκευή).
5. Τοποθετήστε τις καθαρισμένες λάχνες στο μικρότερο τρυβλίο Petri με 2 mL μέσου (χωρίς ορμό) χρησιμοποιώντας λαβίδα και κατόπιν μεταφέρετε τις λάχνες και το μέσο σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρου των 15 mL.

Χρήση του CHANG Amnio για πρωτογενείς καλλιέργειες της CVS

1. Προσθέστε 4 σταγονές του αντιβιοτικού (δηλαδή θειική γενταμικίνη, 50 μg/mL) στο σωληνάριο φυγοκέντρου και αφήστε το για 30 λεπτά.
2. Φυγοκεντρίστε τις λάχνες στα 1.400 σ.α.λ. περίπου για 5 λεπτά.
3. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL μέσου πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος).

4. Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος με ήπιες κινήσεις. Προσθέστε 2 mL του μέσου CHANG Amnio στο σωληνάριο φυγοκέντρου.
5. Επαναλάβετε τα βήματα 2-3. Προσθέστε 2 mL θρυψίνης και επώαστε την καλλιέργεια αδιατάρακτη σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C, για 10 λεπτά. Αφαιρέστε το σωληνάριο φυγοκέντρου από τον επωαστήρα, επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος και τοποθετήστε το σε επωαστήρα για 10 ακόμη λεπτά.
6. Αφαιρέστε το σωληνάριο φυγοκέντρου από τον επωαστήρα, επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος και φυγοκεντρίστε για 8-10 λεπτά στις 1.400 σ.α.λ.
7. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο. Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος, κατόπιν προσθέστε 1 mL κολλαγενάσης στο σωληνάριο και τοποθετήστε σε επωαστήρα για 5 λεπτά.
8. Αφαιρέστε από τον επωαστήρα και επιθεωρήστε οπτικά για να δείτε εάν το συσσωμάτωμα είναι θελωρό και δεν μπορούν να παρατηρηθούν διακριτά μεμονωμένα τμήματα λαχνών. Εάν το συσσωμάτωμα δεν είναι θελωρό, επανατοποθετήστε στον επωαστήρα για 5 λεπτά.
9. Επαναλάβετε το βήμα 8 μέχρι να γίνει θελωρό το συσσωμάτωμα. Προσθέστε 3 mL του CHANG Amnio στο σωληνάριο φυγοκέντρου για τη διακοπή της δράσης της κολλαγενάσης.
10. Φυγοκεντρίστε το σωληνάριο για 8-10 λεπτά στις 1.400 σ.α.λ.
11. Αναρροφήστε το υπερκείμενο υγρό από το φυγοκεντρισμένο σωληνάριο, αφήνοντας περίπου 0,5 mL μέσου πάνω από το κυτταρικό συσσωμάτωμα (ή περίπου 2 φορές τον όγκο του συσσωματώματος). Επαναλάβετε την εναιώρηση του συσσωματώματος προτού προσθέσετε το CHANG Amnio που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των καλλιεργείων.
12. Παρασκευάστε τον βέλτιστο αριθμό καλλιεργείων (περίπου 1 καλλιέργεια ανά κάθε 5 mg λαχνών που χρησιμοποιούνται) χρησιμοποιώντας 0,5 mL του CHANG Amnio ανά καλλιέργεια, για κάθε τρυβλίο Petri που περιέχει μια καλυπτρίδα.
13. Επωάστε τις καλλιέργειες αδιατάρακτες σε ατμόσφαιρα 5%-8% CO<sub>2</sub> στους 37 °C.
14. Γεμίστε τις καλλιέργειες τη 2η ημέρα, προσθέτοντας 1,5 mL CHANG Amnio.
15. Μετά από 4 ημέρες, οι καλλιέργειες θα πρέπει να ελέγχονται για την ανάπτυξή τους. Εάν παρατηρηθεί ανάπτυξη, αφαιρέστε τα μέσα και προσθέστε 2 mL φρέσκου CHANG Amnio σε κάθε καλυπτρίδα. Η θρέψη των καλλιεργείων θα πρέπει να γίνεται κάθε 2 ημέρες από αυτό το σημείο και έπειτα. Για αιματηρά δείγματα, οι καλλιέργειες μπορεί να χρειάζονται πιο συχνές αλλαγές μέσου.
16. Ελέγξτε την ανάπτυξη των καλλιεργείων την 5η ημέρα και συλλέξτε όταν παρατηρηθούν επαρκείς αποικίες.
17. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν οι καλλιέργειες τρέφονται με CHANG Amnio την ημέρα πριν από τη συλλογή.

### ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Φυλάσσετε κατεψυγμένο κάτω από τους -10 °C. Το προϊόν είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα της φιάλης, όταν φυλάσσεται κατεψυγμένο. Το μη χρησιμοποιημένο προϊόν μπορεί να διανεμηθεί σε κλάσματα εργασίας και να επανακαταψυχθεί για επακόλουθη χρήση ή να ψυματιστεί σφικτά και να φυλαχθεί στους 2 °C έως 8 °C, για έως και 30 ημέρες. Μπορεί να καταψυχθεί το μέγιστο δύο φορές. Προστατέψτε το από θροφίζον φως.

### ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η συσκευή αυτή προορίζεται για χρήση από προσωπικό που έχει εκπαιδευτεί σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν την υποδεικνυόμενη εφαρμογή για την οποία προορίζεται η συσκευή. Μη χρησιμοποιείτε καμία φιάλη στην οποία έχει παραβιαστεί η ακεραιότητα της αποστειρωμένης συσκευασίας.

Μη χρησιμοποιείτε το CHANG Amnio μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που υποδεικνύεται στην ετικέτα.

## ČEŠTINA

### INDIKACE PRO POUŽITÍ

CHANG Amnio s gentamicinem a L-glutaminem lze použít pro tyto aplikace:

1. primokultivace buněk z plodové vody
2. pěstování pasážovaných buněk z plodové vody
3. odběr vzorků pevné amniotické tkáně z choriových klků

Toto médium je určeno k použití v CO<sub>2</sub> inkubátorech (kultury ekvilibrovány s atmosférou s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>).

Konečné pH musí být 6,65–7,44. Viz návod k použití.

### POPIS PROSTŘEDKU

CHANG Amnio kompletní médium připravené k použití k primokultivaci lidských buněk z plodové vody, vzorků choriových klků a produktů koncepce k použití při karyotypizaci a jiných prenatalních genetických testech. Bylo optimalizováno pro metody s použitím kultivační lahve i metody in situ. Tento výrobek obsahuje antibiotikum gentamicin-sulfát (50 µg/ml).

### SLOŽKY

<b>Pufry</b> Hydrogenuhličitan sodný	<b>Proteiny, hormony a růstové faktory</b> Fetální bovinní sérum (FBS) Novorozenecké bovinní sérum Lidský transferin Fibroblastový růstový faktor (FGF) Inzulín Progesteron Testosteron Beta-estradiol Hydrokortison	Síran hořečnatý Fosforečnan sodný
<b>Antioxidant</b> Kyselina thioktová	<b>Nukleové kyseliny</b> Deoxyadenosin Deoxycytidin Deoxyguanoin	<b>Nukleové kyseliny</b> Deoxyadenosin Deoxycytidin Deoxyguanoin
<b>Antibiotikum</b> Gentamicin-sulfát	<b>Aminokyselina</b> Alanin Arginin Asparagin Kyselina asparagová Cystein Kyselina glutamová Glutamin Glycin Histidin Isoleucin Leucin Lysin Methionin Fenylalanin Prolin Serin Threonin Tryptofan Tryptosin Valin	<b>Ostatní</b> Ethylalkohol Thyrolin <b>Vitaminy a stopové prvky</b> Kyselina askorbová Kyselina listová Nikotinamid Riboflavin Thiamin Kyselina pantothenová Kobalamin Pyridoxin Biotin <b>Voda</b> V kvalitě vody pro injekci
	<b>Indikátor pH</b> Fenolová červená	
	<b>Energetické substráty</b> Glukóza Pyruvát Inositol	
	<b>Soli a ionty</b> Chlorid sodný Seleničitan sodný Chlorid vápenatý Cholinchlorid Chlorid draselný Fosforečnan draselný	

### ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

#### STERILITA

Sérum používané k výrobě CHANG Amnio bylo testováno na přítomnost virové kontaminace podle předpisů CFR hlava 9 část 113.53. Byl také proveden screening na kontaminaci mykoplasmaty. CHANG Amnio je sterilizováno filtrací o jemnosti 0,1 mikronu. Vzorky CHANG Amnio jsou testovány na možnou bakteriální kontaminaci podle protokolu testování sterility popsáného v aktuálně používaném testu na kontrolu sterility podle lékopisu USA <71>.

### PŘÍPRAVA K POUŽITÍ

Rychle rozmrazte kroužením lahve ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

CHANG Amnio obsahuje gentamicin-sulfát (50 µg/ml). Podle potřeby lze přidat další antibiotika.

#### ROZDĚLENÍ CHANG Amnio

1. Rozmrazte CHANG Amnio podle výše uvedených pokynů.
2. Asepticky rozdělte na díly o příhodném objemu a znovu zmrazte.
3. Až je budete připraveni použít, rozmrazte díly ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

### NÁVOD K POUŽITÍ

Použití média CHANG Amnio k primokultivaci: metody *in situ*

1. Odstředováním plodové vody při 1 200 ot./min po dobu

10 minut koncentrujte buňky.

2. Aspirujte supernatant z odstředěné zkumavky; nad buněčným peletem ponechte přibližně 0,5 ml odstředěné plodové vody (přibližně 2× více, než je objem peletu). Nadávkuje supernatant (nejméně 1 ml, pokud je to možné) k případnému testování na alfa-fetoprotein (AFP) a acetylcholinesterázu. Pokud je vzorek krvavý, připravte další díl k dalšímu testování. Resuspendujte buněčný pelet v malém objemu vlastní plodové vody pacientky. Ke koncentrované buněčné suspenzi přidejte dostatečné množství CHANG Amnio, abyste výsledně měli 0,5 ml na jedno krycí sklíčko (celkem 4 krycí sklíčka v závislosti na velikosti buněčného peletu) nebo 2 ml na kultivační lahvičku. Pokud obdržíte vzorek od pacientky ve třetím trimestru těhotenství, může pelet být větší, ale může obsahovat méně životaschopných buněk, takže může být potřeba silnější nasazení (méně média než normálně).
3. Inkubujte kultury nerušené při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
4. 2. den kultury zaplavte přidáním 2 ml CHANG Amnio. Po 4 až 5 dnech zkontrolujte růst kultur. Jakmile začnou růst, je třeba dodat živiny. Živiny dodejte tak, že odstraníte veškerý supernatant kultury a nahradíte ho 2 ml čerstvého CHANG Amnio. Poté doporučujeme kulturám doplňovat živiny každé 2 dny. Kultury krvavých vzorků mohou vyžadovat častější výměny média.
6. 5. den nebo po něm kontrolujte růst kultur a když zjistíte dostatečné kolonie, proveďte sběr.
7. Optimálních výsledků se dosahuje, pokud jsou kultury vyživeny médiem CHANG Amnio den před sběrem.

Použití média CHANG Amnio k primokultivaci: metody s využitím kultivačních lahví

1. Odstředováním plodové vody při 1 200 ot./min po dobu 10 minut koncentrujte buňky.
2. Aspirujte supernatant z odstředěné zkumavky; nad buněčným peletem ponechte přibližně 0,5 ml odstředěné plodové vody (přibližně 2× více, než je objem peletu). Nadávkuje supernatant (nejméně 1 ml, pokud je to možné) k případnému testování na alfa-fetoprotein (AFP) a acetylcholinesterázu. Pokud je vzorek krvavý, připravte další díl k dalšímu testování. Resuspendujte buněčný pelet v malém objemu vlastní plodové vody pacientky. Přidejte 4 ml média CHANG Amnio; celkový objem na kultivační lahev bude 5 ml. Pokud obdržíte vzorek od pacientky ve třetím trimestru těhotenství, může pelet být větší, ale může obsahovat méně životaschopných buněk, takže může být potřeba silnější nasazení (méně média než normálně).
3. Inkubujte kultury nerušené při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
4. 5. den zkontrolujte růst. Nahraďte médium 2 ml čerstvého média CHANG Amnio a, pokud zjistíte dostatečný růst buněk, proveďte sběr.
5. Následně kontrolujte růst kultur a provádějte úplné výměny média každý den, dokud nezjistíte dostatečné kolonie a nejste připraveni ke sběru. Kultury krvavých vzorků mohou vyžadovat častější výměny média.
6. Optimálních výsledků se dosahuje, pokud jsou kultury vyživeny médiem CHANG Amnio den před sběrem.

Použití média CHANG Amnio k pěstování pasážovaných buněk z plodové vody:

Buňky pasážujte ošetřením kultur trypsinem (nebo pronázou apod.) podle běžného postupu u buněk pěstovaných v konvenčním médiu. Ošetření proteázou je však třeba pečlivě monitorovat. Buňky z plodové vody pěstované v médiu CHANG Amnio mají tendenci k větší citlivosti na ošetření proteázou než při pěstování v konvenčním médiu. S ohledem na tuto skutečnost bude možná třeba upravit používaný protokol. Poznámka: pH média používaného k výživě kultur musí být v rozmezí 6,65–7,44 (tj. médium musí mít mírně nažloutlou lososovou barvu). pH lze snadno upravit vložením média s mírně uvolněným uzávěrem do inkubátoru s atmosférou 5 % – 8 % CO<sub>2</sub> přibližně na 30 minut.

Použití média CHANG Amnio k disekci vzorků choriových klků:

1. Připravte jednu Petriho misku 100 mm × 15 mm rozdělenou na 2 oddíly a jednu Petriho misku 60 mm

× 15 mm. Nadávkuje 2 ml média (bez séra) do menší Petriho misky. Nadávkuje 4 ml média do jednoho oddílu větší Petriho misky a 6 ml média do jejího druhého oddílu.

2. Opatrně aspirujte médium a klyky z originální centrifugační zkumavky se vzorkem od pacientky. Médium a klyky přeneste do oddílu větší Petriho misky se 4 ml aspiračního média.
3. Pomocí invertovaného mikroskopu a dvou sterilních kleštíček odstraňte krevní sraženiny a přítomná mateřská decida z vnější choriových klků. Dbejte, abyste křehké klyky nepoškodili. Přeneste očištěné klyky do 6ml oddílu větší Petriho misky.
4. Proveďte finální očištění: uchopte klyky kleštičkami a šetrným vymáčháním při ponoření v médiu odstraňte veškeré nadměrné deciduou, krevní sraženiny nebo nečistoty. Pokud je to možné, vyberte klyky s viditelným rozvětvením a žilami. Vyhodnotte, kolik máte k dispozici klků, a připravte odpovídající optimální počet kultur (5 mg je ideální množství na jednu kulturu; nepřipravuje více než 20 mg klků).
5. Přeneste očištěné klyky kleštičkami do menší Petriho misky s 2 ml média (bez séra) a potom klyky s médiem přeneste do 15ml centrifugační zkumavky.

Použití média CHANG Amnio k primokultivaci vzorků choriových klků

1. Přidejte do centrifugační zkumavky 4 kapky antibiotika (tj. gentamicin-sulfát, 50 µg/ml) a nechte 30 minut odstát.
2. Odstředěte klyky při přibližně 1 400 ot./min po dobu 5 minut.
3. Aspirujte supernatant z odstředěné zkumavky; nad buněčným peletem ponechte přibližně 0,5 ml média (přibližně 2× více, než je objem peletu).
4. Šetrně pelet resuspendujte. Přidejte 2 ml média CHANG Amnio do centrifugační zkumavky.
5. Opakujte kroky 2–3. Přidejte 2 ml trypsinu a inkubujte kulturu nerušené při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub> po dobu 10 minut. Vyměňte zkumavku z inkubátoru, resuspendujte pelet a vraťte do inkubátoru na dalších 10 minut.
6. Vyměňte centrifugační zkumavku z inkubátoru, resuspendujte pelet a odstředěte 8–10 minut na 1 400 ot./min.
7. Aspirujte supernatant z odstředěné zkumavky. Resuspendujte pelet, potom do zkumavky přidejte 1 ml kolagenázy a vložte na 5 minut do inkubátoru.
8. Vyměňte z inkubátoru a vizuálně zkontrolujte, zda je pelet zakalený a zda nejsou vidět žádné jednotlivé kousky klků. Pokud pelet není zakalený, vraťte na 5 minut do inkubátoru.
9. Krok 8 opakujte, dokud pelet nebude zakalený. Přidáním 3 ml média CHANG Amnio do centrifugační zkumavky zastavte účinkování kolagenázy.
10. Odstředěte zkumavku po dobu 8–10 minut při 1 400 ot./min.
11. Aspirujte supernatant z odstředěné zkumavky; nad buněčným peletem ponechte přibližně 0,5 ml média (přibližně 2× více, než je objem peletu). Resuspendujte pelet předtím, než přidáte CHANG Amnio používané k přípravě.
12. Připravte optimální počet kultur (přibližně 1 kultura na každých 5 mg používaných klků) při použití 0,5 ml média CHANG Amnio na kulturu pro každou Petriho misku s krycím sklíčkem.
13. Inkubujte kultury nerušené při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
14. 2. den kultury zaplavte přidáním 1,5 ml CHANG Amnio.
15. 4. den zkontrolujte růst kultur. Pokud zjistíte růst, odstraňte médium a přidejte 2 ml čerstvého média CHANG Amnio ke každému krycímu sklíčku. Poté je třeba kulturám doplňovat živiny každé 2 dny. Kultury krvavých vzorků mohou vyžadovat častější výměny média.
16. 5. den zkontrolujte růst kultur a když zjistíte dostatečné kolonie, proveďte sběr.
17. Optimálních výsledků se dosahuje, pokud jsou kultury vyživeny médiem CHANG Amnio den před sběrem.

### UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Uchovávejte při teplotě nižší než -10 °C. Výrobek je stabilní

do data expirace uvedeného na štítku lahve, pokud je skladován zmrazený. Nespotebovaný výrobek lze rozdělit na díly používané při zpracování a znovu zmrazit k pozdějšímu použití nebo pevně uzavřít a skladovat po dobu až 30 dní při teplotě 2 °C až 8 °C; zmrazit ho lze maximálně dvakrát. Chraňte před fluorescenčním světlem.

### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

Tento prostředek je určen k použití pracovníky školenými v postupech, které zahrnují indikovanou aplikaci, pro kterou je prostředek určený. Nepoužívejte žádnou lahev s poškozeným sterilním balením.

CHANG Amnio nepoužívejte po uplynutí data expirace vyznačeného na štítku.

## 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 CO<sub>2</sub>-inkubatorer (kulturer der er tilpasset en atmosfære på 5-8 % CO<sub>2</sub>).

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

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

### 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

Optøs hurtigt ved at hvirvle 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 opdeltte mængder i et 37 °C vandbad, når de skal bruges.

### BRUGSANVISNING

Anvendelse af CHANG Amnio til primære kulturer: *In situ*-metodologier

1. Centrifuger amnionvæsken ved ca. 1.200 o/min. i 10 minutter for at koncentrere cellerne.
2. Aspirer supernatanten fra centrifugerørret, og efterlad ca. 0,5 ml over cellepelleten (eller ca. 2 x

pelletmængde) 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 koncentrerede 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 % CO<sub>2</sub>.
4. Skyl kulturerne på dag 2 ved at tilsætte 2 ml CHANG Amnio.
5. Efter 4-5 dage skal kulturerens 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 kulturerens 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 centrifugerørret, og efterlad ca. 0,5 ml over cellepelleten (eller ca. 2 x pelletmængde) 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 % CO<sub>2</sub>.
4. Kontroller væksten på dag 5. Udskift mediet med 2 ml friskt CHANG Amnio og høst, hvis der observeres tilstrækkelig cellevækst.
5. Kontroller kulturerens 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 % CO<sub>2</sub> med låget løsnet let i ca. 30 minutter.

Anvendelse af CHANG Amnio til dissektion af CVS:

1. Tag en 100 mm X 15 mm petriskål med 2 delinger og en 60 mm X 15 mm petriskål. Dispenser 2 ml medium (uden serum) i den mindste petriskål. Dispenser 4 ml medium i den ene del af den store petriskål og 6 ml

medium i den anden del af den samme skål.

2. Aspirer forsigtigt medium og villi fra det originale centrifugerør med patientprøven. Dispenser medium og villi ned i den del af den store petriskål med de 4 ml aspirationsmedium.
3. Anvend et omvendt mikroskop og to sterile pincetter, og fjern blodkoagler og evt. maternal decidua, der sidder udvendigt på chorionvilli. Pas på ikke at beskadige de skrøbelige villi. Overfør de rensede villi til 6 ml delen af den store petriskål.
4. Udfør en sidste rengøring med pincetter for at tage fat i villi, og ryst forsigtigt, mens de er i mediet for at fjerne evt. overskydende decidua, blodkoagler eller restmaterialer. Vælg villi med synlige grene og vener, hvis det er muligt. Bestem mængden af tilstedeværende villi for at forberede det optimale antal kulturer (5 mg er en ideel mængde at bruge pr. kultur. Opsæt ikke mere end 20 mg villi).
5. Anbring rensede villi i den mindste petriskål med 2 ml medium (uden serum) ved hjælp af pincetter, og overfør derefter villi og medium til et 15 ml centrifugerør.

Anvendelse af CHANG Amnio til primære kulturer af CVS

1. Tilsæt 4 dråber antibiotika (dvs. gentamicinsulfat, 50 µg/ml) til centrifugerørret i 30 minutter.
2. Centrifuger villi ved ca. 1.400 o/min. i 5 minutter.
3. Aspirer supernatanten fra centrifugerørret, og efterlad 0,5 ml medium over cellepelleten (eller ca. 2 x pelletmængde).
4. Resuspender pelleten forsigtigt. Tilsæt 2 ml CHANG Amnio-medium til centrifugerørret.
5. Gentag trin 2-3. Tilsæt 2 ml trypsin, og inkuber kulturen uforstyrret ved 37 °C, i en 5-8 % CO<sub>2</sub>-atmosfære i 10 minutter. Tag røret ud af inkubatoren, resuspender pelleten, og anbring den i inkubator i yderligere 10 minutter.
6. Tag centrifugerørret ud af inkubatoren, resuspender pelleten, og centrifuger i 8-10 minutter ved 1.400 o/min.
7. Aspirer supernatanten fra centrifugerørret. Resuspender pelleten, tilsæt derefter 1 ml kollagenase til røret, og anbring det i inkubator i 5 minutter.
8. 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 inkubator i 5 minutter.
9. Gentag trin 8, indtil pelleten er uklar. Tilsæt 3 ml CHANG Amnio til centrifugerørret for at stoppe kollagenasereaktionen.
10. Centrifuger røret i 8-10 minutter ved 1.400 o/min.
11. Aspirer supernatanten fra centrifugerørret, og efterlad 0,5 ml medium over cellepelleten (eller ca. 2 x pelletmængde). Resuspender pelleten før tilsætning af CHANG Amnio, der skal bruges til opsætning.
12. Opsæt det optimale antal kulturer (ca. 1 kultur pr. hver 5 mg anvendt villi) ved hjælp af 0,5 ml CHANG Amnio pr. kultur for hver petriskål med et dækglas.
13. Inkuber kulturerne uforstyrret ved 37 °C i en atmosfære med 5-8 % CO<sub>2</sub>.
14. Skyl kulturerne på dag 2 ved at tilsætte 1,5 ml CHANG Amnio.
15. Efter 4 dage skal kulturerens vækst kontrolleres. Hvis der observeres vækst, fjernes mediet, og der tilsættes 2 ml frisk CHANG Amnio til hvert dækglas. Kulturerne skal næres hver anden dag herefter. I forbindelse med blodige prøver kan kulturerne kræve hyppigere medieskift.
16. Kontroller kulturerens vækst på dag 5, og høst, når der observeres nok kolonier.
17. 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.

## SUOMI

### KÄYTTÖAIHE

Gentamysiiniä ja L-glutamiinia sisältävää CHANG Amnio -elatusainetta voidaan käyttää seuraaviin tarkoituksiin:

1. lapsivesisolujen primaariviljely
2. siirrostettujen lapsivesisolujen kasvattaminen
3. kiinteää amnionkalvokudos istukkabiopsiasta.

Tämä elatusaine on suunniteltu käytettäväksi CO<sub>2</sub>-lämpökaapissa (viljelmät, jotka on tasapainotettu 5–8-prosenttiseen CO<sub>2</sub>-ilmakehään).

Lopullisen pH-arvon on oltava 6,65-7,44. Katso käyttöohjeita.

### VÄLINEEN KUVAUS

CHANG Amnio on täydellinen käyttövalmis elatusaine ihmisen lapsivesinesteen soluille (AFC), istukkabiopsianäytteisiin (CVS) ja hedelmöitystuotteisiin (POC) karyotyypin määrittämistä ja muita syntymää edeltäviä geneettisiä testejä varten. Liusos on optimoitu sekä viljelypullo- että in situ -menetelmiä varten. Tämä tuote sisältää gentamysiinisulfaatti-antibiottia (50 µg/ml)

### AINESOSAT

<b>Puskurit</b> natriumbikarbonaatti	<b>Proteiinit, hormonit</b> <b>ja kasvutekijät</b> naudan sikion seerumi (FBS) vastasyntyneen naudan seerumi ihmisen transferriniin fibroblastikasvutekijä (FGF)	<b>Nukleiinihapot</b> deoksiadenosini deoksityidiini deoksiguanosini adenosini sytiidiini guanosini tyidiini uridiini
<b>Antioksidantit</b> tioktiinihappo		<b>Muut</b> etanoli tyroniini
<b>Antibiootti</b> gentamysiinisulfaatti		<b>Vitamiinit ja hivenainekset</b> askorbiinihappo foolihappo nikotiiniamidi riboflaviini tiamiini pantoteeni kobalamiini pyridoksiini biotiini
<b>Aminohappo</b> alanini arginiini asparagiini asparagiinihappo kysteini glutamiinihappo glutamiini glysiini histidiini isoleusiini leusiini lyysiini metioniini fenyyylalaniini proliini seriini treoniini tryptofaani tyrosiini valiini	<b>pH-indikaattori</b> fenolipuna <b>Energiasubstraatit</b> glukoosi pyruvaatti inositoli <b>Suolat ja ionit</b> natriumkloridi natriumseleniitti kalsiumkloridi koliinikloridi kaliumkloridi kaliumfosfaatti magnesiumsulfaatti natriumfosfaatti	

### LAADUNVARMENNUS

#### STERIILIIYS

CHANG Amnio -tuotteen valmistuksessa käytettävä seerumi on testattu viruskontaminaation varalta CFR-säännöksen osan 9 pykälän 113.53 mukaisesti. Se on seulottu myös mykoplasma-kontaminaation varalta. CHANG Amnio on steriloitu suodattamalla 0,1 mikronin suodattimen läpi. CHANG Amnio -tuotteen näytteet testataan mahdollisen bakteerikontaminaation varalta noudattaen nykyisessä USP-steriiliyystestissä <71> kuvattua steriilitestausmenettelyä.

### KÄYTÖN VALMISTELU

Sulata nopeasti, 37 °C:n veshauteessa pulloa pyörittäen.

CHANG Amnio sisältää gentamysiiniä (50 mg/ml). Haluttaessa voidaan lisätä muita antibiootteja.

#### CHANG Amnio -LIUKSEN JAKAMINEN ERIIN

1. Sulata CHANG Amnio edellä olevia ohjeita noudattaen.
2. Jaa aseptista menettelyä käyttäen kätevästi kokosiini eriin ja pakasta uudelleen.
3. Kun elatusainetta tarvitaan käyttöön, sulata erät 37 °C:n veshauteussa.

### KÄYTTÖOHJEET

CHANG Amnio -liuksen käyttäminen primaariviljelmiin: *in situ* -menetelmä

1. Sentrifugoi lapsivesinäytettä noin nopeudella 1 200 rpm 10 minuutin ajan solujen konsentroimiseksi.

2. Aspiroi supernatantti sentrifugoidusta putkesta. Jätä noin 0,5 ml sentrifugoitua lapsivettä solupelletin päälle (tai noin 2 kertaa pelletin tilavuus). Jaa supernatantti (vähintään 1 ml, jos mahdollista) alfafetoproteiiniin (AFP) ja asetyylikoliniinesteraasin määrityksiin, jos tarpeen. Jos näyte sisältää verta, valmistele lisäerä lisätestausta varten. Suspendoi solusakka uudelleen pieneen määrään potilaan omaa lapsivettä. Lisää riittävästi CHANG Amnio -liuosta konsentroituu solususpensioon, niin että lopullinen maljaustilavuus on 0,5 ml / peitinlasi (yhteensä 4 peitinlasia, solupelletin koon mukaisesti) tai 2 ml / pieni viljelypullo. Jos näyte saadaan potilaasta, joka on raskauden viimeisellä kolmanneksella, pelletti voi olla suurempi, mutta se voi sisältää elinkykyisiä soluja vähemmän, jolloin tarvitaan runsaampaa ympäystä (vähemmän elatusainetta kuin tavallisesti).
3. Inkuboi viljelmiä ilman häiriöitä 37 °C:ssa 5–8-prosenttisesti CO<sub>2</sub>-ilmakehässä.
4. Lisää viljelmiin 2 ml CHANG Amnio -liuosta päivänä 2.
5. Viljelmien kasvu on tarkistettava 4–5 päivän kuluttua. Viljelmiä on ravittava, kun kasvua on havaittu. Ravitse viljelmiä poistamalla koko viljelmäsurnatantti ja korvaamalla se 2 ml:lla tuoretta CHANG Amnio -liuosta. On suositeltavaa, että viljelmiä ravitaan tämän jälkeen 2 päivän välein. Jos näytteet sisältävät verta, viljelmiin on ehkä tehtävä liuosvaihto tiheämmin.
6. Tarkista viljelmien kasvu päivänä 5 tai sen jälkeen. Kerää solut, kun havaitaan riittävästi pesäkkeitä.
7. Parhaat tulokset saadaan, kun viljelmiä ravitaan CHANG Amnio -liuksella keräämistä edeltävänä päivänä.

CHANG Amnio -liuksen käyttäminen primaariviljelmiin: Pullomenetelmät

1. Sentrifugoi lapsivesinäytettä noin nopeudella 1 200 rpm 10 minuutin ajan solujen konsentroimiseksi.
2. Aspiroi supernatantti sentrifugoidusta putkesta. Jätä noin 0,5 ml sentrifugoitua lapsivettä solupelletin päälle (tai noin 2 kertaa pelletin tilavuus). Jaa supernatantti (vähintään 1 ml, jos mahdollista) alfafetoproteiiniin (AFP) ja asetyylikoliniinesteraasin määrityksiin, jos tarpeen. Jos näyte sisältää verta, valmistele lisäerä lisätestausta varten. Suspendoi solusakka uudelleen pieneen määrään potilaan omaa lapsivettä. Lisää 4 ml CHANG Amnio -liuosta lopulliseen maljaustilavuuteen 5 ml / viljelypullo. Jos näyte saadaan potilaasta, joka on raskauden viimeisellä kolmanneksella, pelletti voi olla suurempi, mutta se voi sisältää elinkykyisiä soluja vähemmän, jolloin tarvitaan runsaampaa ympäystä (vähemmän elatusainetta kuin tavallisesti).
3. Inkuboi viljelmiä ilman häiriöitä 37 °C:ssa 5–8-prosenttisesti CO<sub>2</sub>-ilmakehässä.
4. Tarkista kasvu päivänä 5. Vaihda elatusaine 2 ml: aan tuoretta CHANG Amnio -liuosta ja kerää solut, jos havaitaan riittävää solukasvua.
5. Tarkista viljelmien kasvu ja vaihda elatusaine sen jälkeen kokonaan uuteen joka päivä, kunnes havaitaan riittävästi pesäkkeitä ja ne ovat valmiita kerättäviksi. Jos näytteet sisältävät verta, viljelmiin on ehkä tehtävä liuosvaihto tiheämmin.
6. Parhaat tulokset saadaan, kun viljelmiä ravitaan CHANG Amnio -liuksella keräämistä edeltävänä päivänä.

CHANG Amnio -liuksen käyttäminen siirrostettujen lapsivesisolujen kasvattamiseen:

Siirrosta solut käsittelemällä viljelmät trypsiinillä (tai pronaasilla jne.) kuten normaalistikin, kun soluja kasvatetaan perinteisessä elatusaineessa. Proteaasikäsitteily on kuitenkin valvottava huolella. CHANG Amnio -liuksessa kasvatetut lapsivesisolut ovat herkempiä proteaasikäsitelyle kuin perinteisessä elatusaineessa kasvatetut solut. Kasvatusmenetelmää on ehkä muutettava tämän huomioon ottamiseksi. Huomautus: Viljelmien ravitsemiseen käytettävän liuksen pH:n on oltava 6,65–7,44 (ts. elatusaineen värin on oltava hieman kellertävä tai lohenpunainen). pH:ta voidaan säätää helposti asettamalla elatusaine 5–8 %:n CO<sub>2</sub>-lämpökaappiin noin 30 minuutin ajaksi korkki hieman löysällä.

CHANG Amnio -liuksen käyttäminen

istukkabiopsianäytteisiin:

1. Ota yksi 100 mm X 15 mm:n petrimalja, joka on jaettu 2 osaan, ja yksi 60 mm X 15 mm:n petrimalja. Jaa 2 ml liuosta (ilman seerumia) pienempään petrimaljaan. Jaa 4 ml liuosta suuremman petrimaljan yhteen osaan ja 6 ml liuosta saman maljan toiseen osaan.
2. Aspiroi varovasti liuos ja istukkavillus alkuperäisestä, potilaan näyteen sisältävästä sentrifugiputkesta. Jaa liuos ja istukkavillus suuremman petrimaljan siihen osaan, jossa on 4 ml liuosta.
3. Poista käänteismikroskooppia ja kaksi steriilejä pinsettejä käyttäen verihyytymät ja kaikki näytteessä esiintyvät, äidiltä peräisin oleva desidia korionvilluksen ulkopuolelta. Varo, ettet vaurioita haurasta villusta. Siirrä puhdistettu villus suuremman petrimaljan siihen osaan, jossa on 6 ml liuosta.
4. Tee lopullinen puhdistus ottamalla pinseteillä kiinni villuksesta ja ravistelemalla varovasti liukseen upotettuna, jotta kaikki jäljellä oleva desidia, verihyytymät tai jäämät poistuvat. Valitse villus, jossa on näkyviä harjoja ja suoniat, jos mahdollista. Määritä saadun villuksen määrä, jotta voit valmistella optimaalisen määrän viljelmiä (ideaalinen määrä viljelmää kohti on 5 mg; älä käytä yli 20 mg villusta).
5. Aseta puhdistettu villus pinsettien avulla pienempään petrimaljaan, jossa on 2 ml liuosta (ilman seerumia). Siirrä sitten villus ja liuos 15 ml:n sentrifugiputkeen.

CHANG Amnio -liuksen käyttäminen istukkabiopsianäytteiden primaariviljelyyn

1. Lisää 4 pisaraa antibioottia (ts. gentamysiinisulfaattia, 50 µg/ml) sentrifugiputkeen 30 minuutin ajaksi.
2. Sentrifugoi villus noin nopeudella 1 400 rpm 5 minuutin ajan.
3. Aspiroi supernatantti sentrifugoidusta putkesta. Jätä 0,5 ml liuosta solupelletin päälle (tai noin 2 kertaa pelletin tilavuus).
4. Suspendoi solut varovasti uudelleen. Lisää 2 ml CHANG Amnio -liuosta sentrifugiputkeen.
5. Toista vaiheet 2–3. Lisää 2 ml trypsiiniä ja inkuboi viljelmää ilman häiriöitä 37 °C:ssa ja 5–8 %:n CO<sub>2</sub>-ilmakehässä 10 minuutin ajan. Ota putki lämpökaapista, uudelleensuspendoi pelletti ja aseta inkubaattoriin vielä 10 minuutiksi.
6. Ota sentrifugiputki lämpökaapista, uudelleensuspendoi pelletti ja sentrifugoi 8–10 minuuttia nopeudella 1 400 rpm.
7. Aspiroi supernatantti sentrifugoidusta putkesta. Uudelleensuspendoi pelletti, lisää sitten 1 ml kollagenaasia putkeen ja aseta lämpökaappiin 5 minuutiksi.
8. Ota putki lämpökaapista ja tarkista silmämääräisesti, onko pelletti samaa ja voidaanko nähdä yhtään erillistä yksittäistä villusta. Jos pelletti ei ole samaa, aseta takaisin lämpökaappiin 5 minuutiksi.
9. Toista vaihetta 8, kunnes pelletti on samaa. Lisää 3 ml CHANG Amnio -liuosta sentrifugiputkeen kollagenaasin vaikutuksen lopettamiseksi.
10. Sentrifugoi putkea 8–10 minuuttia nopeudella 1 400 rpm.
11. Aspiroi supernatantti sentrifugoidusta putkesta. Jätä 0,5 ml liuosta solupelletin päälle (tai noin 2 kertaa pelletin tilavuus). Uudelleensuspendoi pelletti, ennen kuin lisäät CHANG Amnio -liuksen valmistelua varten.
12. Valmistele optimaalinen määrä viljelmiä (noin 1 viljelmä jokaista käytettyä 5 mg:n villusmäärää kohden) käyttäen 0,5 ml CHANG Amnio -liuosta / viljelmä kutakin peitinlasin sisältävää petrimaljaa kohden.
13. Inkuboi viljelmiä ilman häiriöitä 37 °C:ssa 5–8-prosenttisesti CO<sub>2</sub>-ilmakehässä.
14. Lisää viljelmiin 1,5 ml CHANG Amnio -liuosta päivänä 2.
15. Viljelmien kasvu on tarkistettava 4 päivän kuluttua. Jos kasvua havaitaan, poista liuos ja lisää 2 ml tuoretta CHANG Amnio -liuosta kullekin peitinlasille. Viljelmiä on ravittava tämän jälkeen 2 päivän välein. Jos näytteet sisältävät verta, viljelmiin on ehkä tehtävä liuosvaihto tiheämmin.
16. Tarkista viljelmien kasvu päivänä 5. Kerää solut, kun havaitaan riittävästi pesäkkeitä.
17. Parhaat tulokset saadaan, kun viljelmiä ravitaan

CHANG Amnio -liuksella keräämistä edeltävänä päivänä.

### SÄILYTTÄMINEN JA STABILIIUS

Säilytä pakastettuna alle -10 °C:ssa. Tuote on stabiilia pullon etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään saakka, kun liuosta säilytetään pakastettuna. Käyttämätön liuos voidaan jakaa työskentelyeriin ja pakastaa uudelleen myöhempää käyttöä varten. Liusos säilyy tiukasti korkilla suljettuna ja 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 30 päivää; se voidaan pakastaa enintään kaksi kertaa. Suojaa loistevalaisimen valolta.

### VAROTOIMET JA VAROITUKSET

Tämä väline on tarkoitettu sellaisen henkilöstön käytettäväksi, joka on koulutettu menetelmiin, joihin kuuluu välineen tarkoitettu, käyttöaiheen mukainen käyttö. Älä käytä pulloa, jos sen steriili pakkaus ei ole ehjä. Älä käytä CHANG Amnio -liuosta etiketissä osoitetun viimeisen käyttöpäivän jälkeen.

## LATVISKI

### LIETOŠANAS INDIKĀCIJA

Barotni „CHANG Amnio” ar gentamicīnu un L-glutamīnu var lietot tālāk norādītajos gadījumos.

1. Augļa ūdens šūnu primārā kultivēšana.
2. Pārsētu augļa ūdens šūnu audzēšana.
3. Kompaktajiem amnija audiem, kas iegūti horija bārkstīņu parauga izmeklēšanā.

Šī barotne ir paredzēta izmantošanai CO<sub>2</sub> inkubatoros (kultūras līdzsvaro 5–8 % CO<sub>2</sub> vidē).

Galīgajam pH līmenim jābūt 6,65–7,44. Skatīt lietošanas norādījumus.

### IERĪCES APRAKSTS

„CHANG Amnio” ir pilnīga, lietošanai gatava barotne cilvēka augļa ūdens šūnu (*amniotic fluid cells – AFC*), horiona bārkstīņu paraugu (*chorionic villus sampling – CVS*), kā arī apaugļošanās līdzekļu (*products of conception – POC*) primārai kultivēšanai lietošanai karioģenēzē noteiktāšanā un citu prenatalo ģenētisko testu veikšanā. Tā ir optimizēta izmantošanai gan flakona, gan in situ metodēm. Šis produkts satur antibiotiku gentamicīna sulfātu (50 µg/ml).

### SASTĀVDAĻAS

<b>Buferi</b> Nātrija bikarbonāts	<b>Proteīni, hormoni un augšanas faktori</b> Lielopu embriju serums ( <i>fetal bovine serum – FBS</i> ) Lielopu jaundzimušo telu serums Cilvēka transferīns Fibroblastu augšanas faktors ( <i>fibroblast growth factor – FGF</i> ) Insulīns Progesterons Testosterons Glicīns Bēta estradiols Hidrokortizons	Kālija hlorīds Kālija fosfāts Magnija sulfāts Nātrija fosfāts
<b>Antioksidanti</b> Tioctīnskābe	Lielopu embriju serums ( <i>fetal bovine serum – FBS</i> ) Lielopu jaundzimušo telu serums Cilvēka transferīns Fibroblastu augšanas faktors ( <i>fibroblast growth factor – FGF</i> ) Insulīns Progesterons Testosterons Glicīns Bēta estradiols Hidrokortizons	Nukleīnskābes Dezoksadenozīns Dezoksicitidīns Dezoksiguanozīns Adenozīns Citidīns Guanozīns Timidīns Uridīns
<b>Antibiotikas</b> Gentamicīna sulfāts	Lielopu jaundzimušo telu serums Cilvēka transferīns Fibroblastu augšanas faktors ( <i>fibroblast growth factor – FGF</i> ) Insulīns Progesterons Testosterons Glicīns Bēta estradiols Hidrokortizons	<b>Citas</b> Etilspirts Tironīns
<b>Aminoskābe</b> Alanīns Arginīns Asparģīns Asparģīnskābe Cisteīns Glutamīnskābe Glutamīns Glicīns Histidīns Izoleicīns Leicīns Lizīns Metionīns Fenilalanīns Prolīns Serīns Treonīns Triptofāns Tirozīns Valīns	<b>pH indikators</b> Fenolsarkanais	<b>Vitamīni un mikroelementi</b> Askorbīnskābe Folijskābe Nikotīnamīds Riboflavīns Riboflavīns Tiamins Pantotēnskābe Kobalamīns Piridoksīns Biotīns
<b>Enerģijas substrāti</b> Glikoze Piruvāts Inozīts	<b>Sāļi un joni</b> Nātrija hlorīds Nātrija selenīts Kalcija hlorīds Holīna hlorīds	<b>Ūdens</b> Injekciju ūdens ( <i>WFI</i> ) kvalitāte

### KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

#### STERILITĀTE

„CHANG Amnio” ražošanā izmantotais serums pārbaudīts, lai noteiktu vīrusālo piesārņojumu, saskaņā ar nosacījumiem Federālo normatīvo aktu kodeksa (*Code of Federal Regulation – CFR*) 9. sadaļas 113.53. nodaļā. Tas pārbaudīts arī, lai noteiktu piesārņojumu ar mikoplazmu. „CHANG Amnio” ir sterilizēts, filtrējot caur 0,1 mikronu filtru. „CHANG Amnio” paraugi pārbaudīti, lai noteiktu iespējamo bakteriālo piesārņojumu, atbilstoši sterilitātes testēšanas protokolam, kas aprakstīts pašreizējā ASV Farmakopejas (*USP*) sterilitātes testā <71>.

### SAGATAVOŠANA LIETOŠANAI

Ātri atkausējiet, pudeli virpinot 37 °C ūdens vannā.

„CHANG Amnio” satur gentamicīnu (50 mg/l). Ja vēlams, var pievienot papildu antibiotikas.

„CHANG Amnio” DALĪŠĀNĀ ALIKVOTAJĀS DAĻĀS

1. Atkausējiet „CHANG Amnio” atbilstoši iepriekš minētajam instrukcijām.
2. Aseptiskā veidā sadaliet piemērota lieluma alikvotajās daļās un atkārtoti atkausējiet.
3. Alikvotās daļas atkausējiet 37 °C ūdens vannā, kad esat gatavs tās lietot.

### LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

„CHANG Amnio” lietošana primārai kultivēšanai: *in situ* metodes

1. Centrifugējiet augļa ūdeņu šķidrumu ar ātrumu 1200 apgr./min 10 minūtes, lai koncentrētu šūnas.
2. Aspirējiet supernatantu centrifugētajā stobriņā, atstājot aptuveni 0,5 ml centrifugētā augļa ūdeņu šķidruma virs šūnas lodītes (vai aptuveni 2x lodītes tilpumu). Ja nepieciešams, dozējiet supernatantu (ja iespējams, vismaz 1 ml) alfa-fetoproteīnam (AFP) un acetil-holinesterāzes testiem. Ja paraugs ir asiņains, sagatavojiet papilddozu turpmāki testēšanai. Šūnu lodīti atkārtoti suspendējiet nelielā daudzumā paša pacienta augļa ūdens. Koncentrētajai šūnu suspensijai pievienojiet pietiekamu daudzumu „CHANG Amnio”, lai iegūtu galīgo uzsēšanas daudzumu 0,5 ml uz katru segstiklīņu (pavisam 4 segstiklīņi, atkarībā no šūnu lodītes lieluma) vai 2 ml uz flakonu. Ja paraugs paņemts no pacientes, kura ir grūtniecības trešajā trimestrī, lodīte var būt liela, bet saturēt mazāku dzīvotspējīgu šūnu skaitu, tādējādi var būt nepieciešama ilgāka uzsēšana (izmantojot mazāk barotnes, nekā ierasts).
3. Netraucēti inkubējiet kultūras 37 °C temperatūrā 5–8 % CO<sub>2</sub> vidē.
4. 2. dienā uzpludiniet kultūras, pievienojot 2 ml „CHANG Amnio”.
5. Pēc 4–5 dienām jāpārbauda kultūru augšana. Tiklīdz novēro augšanu, kultūras jāpapildina. Papildiniet kultūras, ņemot visu kultūras supernatantu un aizvietojot to ar 2 ml svaigas „CHANG Amnio”. Pēc tam ieteicams kultūras papildināt ik pēc 2 dienām. Asiņainiem paraugiem var būt nepieciešama biežāka barotnes, nekā ierasts.
6. 5. dienā vai pēc tās pārbaudiet kultūru augšanu un, kad novēro pietiekama apjoma kolonijas, ievāciet šūnas.
7. Vislabākos rezultātus iegūst, ja kultūras papildina ar „CHANG Amnio” vienu dienu pirms ievākšanas.

„CHANG Amnio” lietošana primārai kultivēšanai: flakona metodes

1. Centrifugējiet augļa ūdeņu šķidrumu ar aptuveno ātrumu 1200 apgr./min 10 minūtes, lai koncentrētu šūnas.
2. Aspirējiet supernatantu centrifugētajā stobriņā, atstājot aptuveni 0,5 ml centrifugētā augļa ūdeņu šķidruma virs šūnas lodītes (vai aptuveni 2x lodītes tilpumu). Ja nepieciešams, dozējiet supernatantu (ja iespējams, vismaz 1 ml) alfa-fetoproteīnam (AFP) un acetil-holinesterāzes testiem. Ja paraugs ir asiņains, sagatavojiet papilddozu turpmāki testēšanai. Šūnu lodīti atkārtoti suspendējiet nelielā daudzumā paša pacienta augļa ūdens. Pievienojiet 4 ml CHANG Amnio, lai iegūtu katra flakona kopējo tilpumu 5 ml. Ja paraugs paņemts no pacientes, kura ir grūtniecības trešajā trimestrī, lodīte var būt liela, bet saturēt mazāku dzīvotspējīgu šūnu skaitu, tādējādi var būt nepieciešama ilgāka uzsēšana (izmantojot mazāk barotnes, nekā ierasts).
3. Netraucēti inkubējiet kultūras 37 °C temperatūrā 5–8 % CO<sub>2</sub> vidē.
4. 5. dienā pārbaudiet augšanu. Barotni aizstājiet ar svaigu 2 ml „CHANG Amnio” un, ja novēro pietiekamu šūnu augšanu, ievāciet tās.
5. Pēc tam katru dienu pārbaudiet kultūru augšanu un pilnībā nomainiet barotni, līdz novēro pietiekama apjoma kolonijas un šūnas ir gatavas ievākšanai. Asiņainiem paraugiem var būt nepieciešama biežāka barotnes maiņa.
6. Vislabākos rezultātus iegūst, ja kultūras papildina ar „CHANG Amnio” vienu dienu pirms ievākšanas.

„CHANG Amnio” lietošana pārsētu augļa ūdens šūnu audzēšanai

Lai pārsētu šūnas, kultūras apstrādājiet ar tripsīnu (vai pronāzi u. c.), kā to parasti darītu, ja šūnas tiktu audzētas standartā barotnē. Tomēr apstrāde ar proteāzi rūpīgi jākontrolē. Barotnē „CHANG Amnio” audzētām augļa ūdens šūnām ir nosliece uz lielāku jutību pret apstrādi ar proteāzi nekā standartā barotnē audzētām šūnām. Lai šo ņemtu vērā, iespējams, jāpārveido protokols.

Piezīme: kultūru papildināšanai izmantotās barotnes pH jābūt 6,65-7,44 (t. i., barotnei jābūt nedaudz iedzeltenā laša krāsā). pH līmenis ir viegli pielāgojams, barotnes flakonu ar nedaudz vaiļgāk uzliktu aizbāzni uz apmēram 30 minūtēm ievietojot 5–8 % CO<sub>2</sub> inkubatorā.

„CHANG Amnio” lietošana CVS secēšanai

1. Paņemiet vienu 100 mm X 15 mm Petri trauciņu, kas ir sadalīts 2 daļās, un vienu 60 mm X 15 mm Petri trauciņu. Dozējiet 2 ml barotnes (bez seruma) mazākajā Petri trauciņā. Dozējiet 4 ml barotnes vienā lielākā Petri trauciņa pusē un 6 ml barotnes tā paša trauciņa otrā pusē.
2. Uzmanīgi aspirējiet barotni no bārkstīņas no oriģinālā centrifūgas stobriņa, kas satur pacienta paraugu. Dozējiet barotni no bārkstīņas lielākā Petri trauciņa daļā ar 4 ml aspirācijas barotnes.
3. Izmantojot inverijas mikroskopu un divas sterilas knaibles, izņemiet asins recekļus un visu atlikušo dzemdes gļotādu, kas redzama horiona bārkstīņu ārpusē. Esiet uzmanīgi, lai izvairītos no trauslo bārkstīņu bojāšanas. Pārnesiet attīrītās bārkstīņas lielā Petri trauciņa daļā ar 6 ml aspirācijas barotnes.
4. Izmantojot knaibles, veiciet pēdējo attīrīšanu, satverot bārkstīņas un uzmanīgi tās maisot, iemērkāts barotnē, lai noņemtu visu pārpalikušo gļotādu, asins recekļus vai pārpalikumsūnas. Ja iespējams, atlasiet bārkstīņas, kurām ir redzami atzari un vēnas. Nosakiet esošo bārkstīņu daudzumu, lai sagatavotu optimālo kultūru skaitu (ideālais lietošanas daudzums kultūrā ir 5 mg; nelietojot vairāk nekā 20 mg bārkstīņu).
5. Izmantojot knaibles, ievietojiet attīrītās bārkstīņas mazākajā Petri trauciņā ar 2 ml barotnes (bez seruma), tad pārnesiet bārkstīņas un barotni 15 ml centrifūgas stobriņā.

„CHANG Amnio” lietošana primārai CVS kultivēšanai

1. Pievienojiet 4 pilienus antibiotikas (t. i., gentamicīna sulfāta, 50 µg/ml) centrifūgas stobriņā un ļaujiet, lai tas nostāvas 30 minūtes.
2. Centrifugējiet bārkstīņas ar aptuveno ātrumu 1400 apgr./min 5 minūtes.
3. Aspirējiet supernatantu centrifugētajā stobriņā, atstājot 0,5 ml barotnes virs šūnas lodītes (vai aptuveni 2x lodītes tilpumu).
4. Uzmanīgi atkārtoti suspendējiet lodīti. Pievienojiet 2 ml „CHANG Amnio” barotnes centrifūgas stobriņam.
5. Atkārtojiet 2.–3. darbību. Pievienojiet 2 ml tripsīna un netraucēti inkubējiet kultūru 37 °C, 5–8 % CO<sub>2</sub> vidē 10 minūtes. Izņemiet stobriņu no inkubatora, atkārtoti suspendējiet lodīti un ievietojiet inkubatorā vēl 10 minūtes.
6. Izņemiet centrifūgas stobriņu no inkubatora, atkārtoti suspendējiet lodīti un centrifugējiet 8–10 minūtes ar ātrumu 1400 apgr./min.
7. Aspirējiet centrifūgas stobriņa supernatantu. Atkārtoti suspendējiet lodīti, tad pievienojiet 1 ml kolagenāzes un ievietojiet inkubatorā uz 5 minūtēm.
8. Izņemiet no inkubatora un vizuāli pārbaudiet, vai lodīte ir duļķaina un nav redzami atsevišķi bārkstīņu gabaliņi. Ja lodīte nav duļķaina, ievietojiet atpakā inkubatorā vēl 5 minūtes.
9. Atkārtojiet 8. darbību, līdz lodīte ir duļķaina. Pievienojiet 3 ml barotnes „CHANG Amnio” centrifūgas stobriņā, lai apturētu kolagenāzes iedarbību.
10. Centrifugējiet stobriņu 8–10 minūtes ar ātrumu 1400 apgr./min.
11. Aspirējiet supernatantu centrifugētajā stobriņā, atstājot 0,5 ml barotnes virs šūnas lodītes (vai aptuveni 2x lodītes tilpumu). Pirms sagatavošanas laikā izmantotā „CHANG Amnio” pievienošanas atkārtoti suspendējiet lodīti.
12. Sagatavojiet optimālo kultūru skaitu (aptuveni 1 kultūra katriem 5 mg lietoto bārkstīņu), lietojot 0,5 ml „CHANG Amnio” katrai Petri trauciņa kultūrai ar segstiklīņu.
13. Netraucēti inkubējiet kultūras 37 °C temperatūrā 5–8 % CO<sub>2</sub> vidē.
14. 2. dienā uzpludiniet kultūras, pievienojot 1,5 ml „CHANG Amnio”.
15. 4. dienā jāpārbauda kultūru augšana. Ja novērojama augšana, ņemiet barotni un katram segstiklīņam pievienojiet 2 ml svaigas „CHANG Amnio”. Pēc tam kultūras jāpapildina ik pēc 2 dienām. Asiņainiem

paraugiem var būt nepieciešama biežāka barotnes maiņa.

16. 5. dienā pārbaudiet kultūru augšanu un, kad novēro pietiekama apjoma kolonijas, ievāciet šūnas.

17. Vislabākos rezultātus iegūst, ja kultūras papildina ar „CHANG Amnio” vienu dienu pirms ievākšanas.

### GLABĀŠANA UN STABILITĀTE

Uzglabāt sasaldētu zemākā temperatūrā par –10 °C. Glabājot sasaldētā veidā, produkts saglabā stabilitāti līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz pudeles etiķetes. Neizlietoto produktu var sadalīt darbā izmantojamās alikvotajās daļās un atkārtoti sasaldēt vēlākai izmantošanai vai cieši noslēgtus glabāt 2 °C–8 °C temperatūrā līdz 30 dienām; to drīkst sasaldēt ne vairāk par 2 reizēm. Aizsargājiet no fluorescējošas gaismas.

### PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI

Šī ierīce ir paredzēta procedūrās, arī tādās, kurām šī ierīce ir paredzēta, apmācīta personāla lietošanai. Nelietojiet nevienu pudeli, kurai ir bojāts sterilitais iesaiņojums.

„CHANG Amnio” nelietot pēc derīguma termiņa, kas norādīts etiķetē.

## 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 CO<sub>2</sub>-incubators (kweken geëquibreerd met 5%-8% CO<sub>2</sub>-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	Eiwitten, hormonen en groeifactoren	Nucleïnezuren
Natriumbicarbonaat	Foetaal runderserum (FBS)	Deoxyadenosine Deoxycytidine Deoxyguanosine Cytidine Guanosine Thymidine Uridine
Antioxidant Alfa-liponzuur	Pasgeboren kalfsersum	
Antibioticum Gentamicinesulfaat	Menselijk transferrine Fibroblast groeifactor (FGF)	Overige Ethylalcohol Thyronine
Aminozuren Alanine Arginine Asparagine Asparaginezuur Cysteïne Glutaminezuur Glutamine Glycine Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Fenylalanine Proline Serine Treonine Tryptofaan Tyrosine Valine	Insuline Progesteron Testosteron Beta-oestradiol Hydrocortison	Ascorbinezuur Foliumzuur Nicotinamide Riboflavine Thiamine Pantotheenzuur Cobalamine Pyridoxine Biotine
	pH-indicator Fenolrood	Vitaminen en spoorelementen
	Zouten en ionen Natriumchloride Natriumseleniet Calciumchloride Cholinechloride Kaliumchloride Kaliumfosfaat Magnesiumsulfaat Natriumfosfaat	Water Farmaceutisch kwaliteitswater (WFI)

### 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 mycoplasma-besmetting. 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 sterilitestprotocol beschreven in de huidige Amerikaanse Farmacopee (USP) sterilitest <71>.

### VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

Ontdooi snel door de fles in een waterbad van 37 °C rond te draaien.

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

### OPDELEN VAN CHANG Amnio

1. Ontdooi CHANG Amnio volgens de bovenstaande instructies.
2. Verdeel op aseptische wijze in praktische hoeveelheden en vries deze opnieuw in.
3. Ontdooi 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 van het gecentrifugeerde buisje en laat ongeveer 0,5 ml van het gecentrifugeerde vruchtwater (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) boven de cel-pellet 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. Resuspendeer de cel-pellet 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 cel-pellet) 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% CO<sub>2</sub>-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 van het gecentrifugeerde buisje en laat ongeveer 0,5 ml van het gecentrifugeerde vruchtwater (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) boven de cel-pellet 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. Resuspendeer de cel-pellet 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% CO<sub>2</sub>-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% CO<sub>2</sub>-incubator te zetten. Gebruik van CHANG Amnio voor de dissectie van CVS:

1. Gebruik één petrischaal van 100 mm x 15 mm verdeeld in twee vakjes en één petrischaal van 60 mm x 15 mm. Doe 2 ml medium (zonder serum) in de kleine petrischaal. Doe 4 ml medium in één vakje van de grote petrischaal en 6 ml medium in het andere vakje van dezelfde petrischaal.
2. Aspireer medium en villi voorzichtig van het originele centrifugeerbuisje met het monster van de patiënt. Doe medium en villi in het vakje van de grote petrischaal met 4 ml gaspierreerd medium.
3. Verwijder bloedklonters en eventuele maternale decidua met behulp van een omgekeerde microscoop en twee steriele forceps van de buitenkant van de chorionvilli. Wees voorzichtig dat u de kwetsbare villi niet beschadigt. Breng de schoongemaakte villi over naar het vakje van de grote petrischaal met 6 ml.
4. Voer een laatste reiniging uit door de villi met forceps op te pakken en ze zachtjes (ondergedompeld in het medium) heen en weer te bewegen, om eventuele resterende decidua, bloedklonters of vuilresten te verwijderen. Kies zo mogelijk villi met zichtbare aftakkingen en aderen. Bepaal de hoeveelheid villi die nodig is voor het prepareren van een optimaal aantal kweken (5 mg per kweek is ideaal; prepareer niet meer dan 20 mg villi).
5. Plaats met behulp van forceps de schoongemaakte villi in de kleine petrischaal met 2 ml medium (zonder serum) en breng villi en medium over naar een 15ml-centrifugeerbuisje.

Gebruik van CHANG Amnio voor primaire kweken van CVS

1. Voeg 4 druppels antibioticum (d.w.z. gentamicinesulfaat, 50 µg/ml) aan het centrifugeerbuisje toe en laat 30 minuten staan.
2. Centrifugeer de villi gedurende 5 minuten op een snelheid van ca. 1400 omw/min.
3. Aspireer het supernatant van het gecentrifugeerde buisje en laat ongeveer 0,5 ml medium boven de cel-pellet (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) staan.
4. Resuspendeer de pellet voorzichtig. Voeg 2 ml CHANG Amnio medium aan het centrifugeerbuisje toe.
5. Herhaal stap 2 en 3. Voeg 2 ml trypsine toe en incubeer de kweek gedurende 10 minuten ongestoord bij 37 °C en 5%-8% CO<sub>2</sub>-atmosfeer. Haal het buisje uit de incubator, resuspendeer de pellet en zet opnieuw 10 minuten in de incubator.
6. Haal het centrifugeerbuisje uit de incubator, resuspendeer de pellet en centrifugeer gedurende 8-10 minuten op 1400 omw/min.
7. Aspireer het supernatant uit het gecentrifugeerde buisje. Resuspendeer de pellet, voeg vervolgens 1 ml collagenase aan het buisje toe en zet gedurende 5 minuten in de incubator.
8. 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 5 minuten terug in de incubator.
9. Herhaal stap 8 tot de pellet troebel is. Voeg 3 ml CHANG Amnio aan het centrifugeerbuisje toe om de werking van de collagenase te stoppen.
10. Centrifugeer het buisje 8-10 minuten op 1400 omw/min.
11. Aspireer het supernatant van het gecentrifugeerde buisje en laat ongeveer 0,5 ml medium boven de cel-pellet (of ongeveer tweemaal het pelletvolume) staan. Resuspendeer de pellet voordat u CHANG Amnio toevoegt voor preparatie.
12. Prepareer het optimale aantal kweken (ongeveer 1 kweek per 5 mg gebruikte villi) met behulp van 0,5 ml CHANG Amnio per kweek voor elke petrischaal met

een dekglasje.

13. Zet de kweken ongestoord in de incubator bij 37 °C en 5%-8% CO<sub>2</sub>-atmosfeer.
14. Bedek de kweken op dag 2 volledig door 1,5 ml CHANG Amnio toe te voegen.
15. Controleer na 4 dagen of de kweken zijn gegroeid. Als er groei wordt waargenomen, verwijdert u het medium en voegt u 2 ml vers CHANG Amnio aan elk dekglasje toe. Voed de kweken daarna elke 2 dagen. Als het monster bloed bevat, kan het nodig zijn het medium vaker te vervangen.
16. Controleer de kweken op dag 5 op groei en oogst als er voldoende koloniën worden waargenomen.
17. 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 opgedeed 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

### PRZEZNACZENIE

Pożyłka CHANG Amnio z gentalaminy i L-glutaminy 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 pożyłkę zaprojektowano do użytku w inkubatorach z atmosferą CO<sub>2</sub> (hodowle doprowadzone do równowagi w atmosferze 5%–8% CO<sub>2</sub>).

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

### OPIS WYROBU

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

### SKŁADNIKI

<b>Bufory</b> Wodorowęglan sodu	<b>Białka, hormony i czynniki wzrostu</b> Płodowa surowica bydłca (FBS)	Fosforan potasu Siarczan magnezu Fosforan sodu
<b>Antyoksydant</b> Kwas tioktanowy	Surowica nowonarodzonych cieląt Ludzka transferyna	<b>Kwasy nukleinowe</b> Deoksyadenozyna Deoksytydyna Deoksyguanozyna
<b>Antybiotyk</b> Siarczan gentaminy	Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF)	Adenozyna Cytidyna Guanozyna Tymidyna Urydyna
<b>Aminokwasy</b> Alanina Arginina Asparagina Kwas asparaginowy Cysteina Kwas glutaminowy Glutamina Glicyna Histydyna Izoleucyna Leucyna Lizyna Metionina Feniloalanina Prolina Seryna Treonina Tryptofan Tyrozyna Walina	Insulina Progesteron Testosteron Beta-estradiol Hydrokortyzon	<b>Witaminy i pierwiastki śladowe</b> Kwas askorbinowy Glukoza Kwas foliowy Nikotynamid Ryboflawina Triamina Kwas pantotenowy Kobalamina Pirydoksyna Biotyna
	<b>Wskaźnik pH</b> Czerwień fenolowa	<b>Woda</b> Woda o jakości WFI
	<b>Substraty energetyczne</b> Glukoza Pirogromian Inozytol	
	<b>Sole i jony</b> Chlorek sodu Selenian sodu Chlorek wapnia Chlorek choliny Chlorek potasu	

### ZAPEWNIANIE JAKOŚCI

#### STERYLNOŚĆ

Surowicę używaną do produkcji pożyłki 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. Pożyłkę CHANG Amnio sterylizowano poprzez filtrację przez filtr o średnicy porów 0,1 mikrona. Próbkę pożyłki 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

Szybko rozmrozić pożyłkę, obracając butelkę ruchem wirowym w łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 37°C.

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

### ROZDZIELANIE POŻYŁKI CHANG Amnio NA PORCJE

1. Rozmrozić pożyłkę CHANG Amnio zgodnie z powyższymi instrukcjami.
2. W sposób aseptyczny rozdzielić pożyłkę na porcje o odpowiednim rozmiarze, a następnie zamrozić ponownie.

3. Gdy porcje będą gotowe do użycia, rozmrozić je w łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 37°C.

### INSTRUKCJA UŻYCIA

Stosowanie pożyłki CHANG Amnio dla hodowli pierwotnych: metody *in situ*

1. Wirować płyn owodniowy przy prędkości około 1200 rpm przez 10 minut, aby zażyć komórki.
2. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając ok. 0,5 ml roztworu nad osadem komórkowym (lub objętość roztworu 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 acetylocholinoesterazy, jeśli jest to konieczne. Jeśli próbka zawiera krew, przygotować dodatkową porcję do dalszych testów. Zawiesić osad komórkowy w małej objętości płynu owodniowego pacjentki. Dodać wystarczającą ilość pożyłki CHANG Amnio do zażętej 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 pożyłki niż zwykle).
3. Inkubować hodowlę w temperaturze 37°C w atmosferze 5%–8% CO<sub>2</sub>, nie zakłócając ich.
4. W dniu 2. zalać hodowlę, dodając 2 ml pożyłki CHANG Amnio.
5. Po 4–5 dniach sprawdzić wzrost hodowli. Po zaobserwowaniu wzrostu należy zasilić hodowlę pożyłką. Zasiłać hodowlę pożyłką, usuwając cały nadsącz hodowli i zastępując go 2 ml świeżej pożyłki CHANG Amnio. Po wykonaniu tej czynności zalecane jest zasilenie hodowli pożyłką co 2 dni. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożyłki.
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 hodowlę pożyłką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

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

1. Wirować płyn owodniowy przy prędkości około 1200 rpm przez 10 minut, aby zażyć komórki.
2. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając ok. 0,5 ml roztworu nad osadem komórkowym (lub objętość roztworu 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 acetylocholinoesterazy, jeśli jest to konieczne. Jeśli próbka zawiera krew, przygotować dodatkową porcję do dalszych testów. Zawiesić osad komórkowy w małej objętości płynu owodniowego pacjentki. Dodać 4 ml pożyłki 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 pożyłki niż zwykle).
3. Inkubować hodowlę w temperaturze 37°C w atmosferze 5%–8% CO<sub>2</sub>, nie zakłócając ich.
4. Sprawdzić wzrost hodowli w 5. dniu. Zmienić pożyłkę na 2 ml świeżej pożyłki CHANG Amnio i zebrać komórki, jeśli zaobserwowano wystarczający wzrost komórek.
5. Po wykonaniu tej czynności codziennie sprawdzać wzrost hodowli i całkowicie wymienić pożyłkę do czasu zaobserwowania wystarczającej liczby kolonii gotowych do zbioru. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożyłki.
6. Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowlę pożyłką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

Stosowanie pożyłki CHANG Amnio do wzrostu pasażowanych komórek płynu owodniowego:

Aby wykonać pasaż komórek, poddać hodowlę działaniu trypsyny (lub pronazy itp.), w taki sam sposób, jak w przypadku komórek rosnących w pożyłce standardowej. Jednakże należy ściśle monitorować komórki poddawane działaniu proteazy. Komórki płynu owodniowego rosnące w pożyłce CHANG Amnio zwykle są bardziej wrażliwe na działanie proteazy niż gdy rosną w pożyłce standardowej. W celu uwzględnienia tego faktu może być konieczne wprowadzenie zmian w protokole. Uwaga: Wartość pH pożyłki używanej do zasilania hodowli musi mieścić się w zakresie 6,65–7,44 (tzn. kolor pożyłki musi być lekko żółtawo-łososiowy). Wartość pH można łatwo wyregulować, umieszczając pożyłkę w butelce z lekko odkręconą zakrętką w inkubatorze z atmosferą 5%–8% CO<sub>2</sub> na około 30 minut.

Stosowanie pożyłki CHANG Amnio do dyssekcji CVS:

1. Uzyskać jedną szalkę Petriego o wymiarach 100 mm x 15 mm podzieloną na 2 części i jedną szalkę Petriego o wymiarach 60 mm x 15 mm. Wylać 2 ml pożyłki (bez surowicy) na mniejszą szalkę Petriego. Wylać 4 ml pożyłki na jedną część dużej szalki Petriego i 6 ml pożyłki na drugą część tej samej szalki.
2. Ostrożnie zaaspirować pożyłkę i kosmki z oryginalnej próbki wirówkowej zawierającej próbkę pacjentki. Wylać pożyłkę i kosmki na część większej szalki Petriego, w której znajdują się 4 ml pożyłki aspiracyjnej.
3. Używając mikroskopu odwróconego i dwóch sterylnych szczypek, usunąć skrzepy krwi i doczesną matkę obecne na powierzchni kosmków kosmówki. Uważać, aby nie uszkodzić delikatnych kosmków. Przenieść oczyszczone kosmki do części większej szalki Petriego, w której znajduje się 6 ml pożyłki.
4. Wykonać końcowe oczyszczanie, używając szczypek do chwytności kosmków i delikatnie wyciągając kosmki, zanurzając je w pożyłce, aby usunąć pozostałości doczesnej, skrzepów krwi lub zanieczyszczeń. Jeśli to możliwe, wybrać kosmki z widocznymi gałęziami i żyłkami. Określić ilość obecnych kosmków w celu przygotowania optymalnej liczby hodowli (5 mg na hodowlę to idealna ilość; nie należy nastawiać hodowli zawierającej więcej niż 20 mg kosmków).
5. Używając szczypek, umieścić oczyszczone kosmki na mniejszej szalce Petriego z 2 ml pożyłki (bez surowicy), a następnie przenieść kosmki i pożyłkę do próbki wirówkowej o pojemności 15 ml.

Stosowanie pożyłki CHANG Amnio do hodowli pierwotnych CVS

1. Dodać 4 krople antybiotyku (tj. siarczanu gentaminy, 50 µg/ml) do próbki wirówkowej i pozostawić na 30 minut.
2. Wirować kosmki przy ok. 1400 rpm przez 5 minut.
3. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki, pozostawiając 0,5 ml roztworu nad osadem komórkowym (lub objętość roztworu równą około 2-krotnej objętości osadu).
4. Delikatnie zawiesić osad. Dodać 2 ml pożyłki CHANG Amnio do próbki wirówkowej.
5. Powtórzyć kroki 2–3. Dodać 2 ml trypsyny i inkubować hodowlę w temperaturze 37°C, w atmosferze 5%–8% CO<sub>2</sub> przez 10 minut, nie zakłócając jej. Wyciągnąć próbkę z inkubatora, ponownie zawiesić osad i umieścić w inkubatorze na dodatkowe 10 minut.
6. Wyciągnąć próbkę z inkubatora, zawiesić osad i wirować przez 8–10 minut przy 1400 rpm.
7. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki. Zawiesić osad, a następnie dodać 1 ml kolagenazy do próbki i umieścić w inkubatorze na 5 minut.
8. Wyciągnąć próbkę z inkubatora, wizualnie sprawdzić, czy osad jest mętny i czy nie widać wyraźnych pojedynczych kawałków kosmków. Jeśli osad nie jest mętny, ponownie umieścić go w inkubatorze na 5 minut.
9. Powtarzać krok 8, aż osad będzie mętny. Dodać 3 ml pożyłki CHANG Amnio do próbki wirówkowej, aby zatrzymać działanie kolagenazy.
10. Wirować próbkę przez 8–10 minut przy 1400 rpm.
11. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej próbówki,

pozostawiając 0,5 ml roztworu nad osadem komórkowym (lub objętość roztworu równą około 2-krotnej objętości osadu). Zawiesić osad przed dodaniem pożyłki CHANG Amnio używanej do nastawiania hodowli.

12. Nastawić optymalną liczbę hodowli (ok. 1 hodowla na każde użyte 5 mg kosmków), używając 0,5 ml pożyłki CHANG Amnio na hodowlę na każdą szalkę Petriego zawierającą szkiełko nakrywkowe.
13. Inkubować hodowlę w temperaturze 37°C w atmosferze 5%–8% CO<sub>2</sub>, nie zakłócając ich.
14. W dniu 2. zalać hodowlę, dodając 1,5 ml pożyłki CHANG Amnio.
15. Po 4 dniach sprawdzić wzrost hodowli. W przypadku zaobserwowania wzrostu usunąć pożyłkę, a następnie dodać 2 ml świeżej pożyłki CHANG Amnio na każde szkiełko nakrywkowe. Po wykonaniu tej czynności zalecane jest zasilenie hodowli pożyłką co 2 dni. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożyłki.
16. Sprawdzić wzrost hodowli w 5. dniu i zebrać komórki, jeśli zaobserwowano wystarczającą liczbę kolonii.
17. Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowlę pożyłką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

### PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Przechowywać w temperaturze poniżej -10°C. Produkt zachowuje stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykiecie butelki, jeśli jest przechowywany w stanie zamrożonym. Nieużyty produkt można rozdzielić na porcje robocze i zamrozić ponownie do późniejszego użytku lub szczerline zamknąć i przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C do 30 dni; można go zamrażać maksymalnie dwa razy. Chronić przed światłem fluorescencyjnym.

### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Ten wyrób jest przeznaczony do użytku przez personel wykwalifikowany w dziedzinie procedur obejmujących wskazane zastosowanie, do którego wyrób ten jest przeznaczony. Nie korzystać z butelek, w przypadku których sterylne opakowanie zostało naruszone. Nie używać pożyłki CHANG Amnio po upływie terminu ważności podanego na etykiecie.



## ROMÂNĂ

### INDICAȚIE DE UTILIZARE

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

1. cultura primară a celulelor din lichidul amniotic
2. creșterea celulelor din lichidul amniotic pasajate
3. țesut amniotic solid din probele de vilii chorionici colectate.

Acest mediu a fost proiectat pentru utilizare în incubatoare cu CO<sub>2</sub> (culturi echilibrate cu o atmosferă cu 5%-8% CO<sub>2</sub>).

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 vilii chorionici (CVS) și produși de concepție (POC) în vederea utilizării pentru cariotipare și alte teste genetice prenatale. Formula a fost optimizată pentru metodologii atât cu flacon, cât și in situ. Acest produs conține antibioticul sulfat de gentamicină (50 µg/ml)

### COMPONENTE

<b>Soluții tampon</b> Bicarbonat de sodiu	<b>Proteine, hormoni și factori de creștere</b> Ser fetal bovin (SFB) Ser neonatal bovin Transferină umană Factor de creștere a fibroblastilor (FCF) Insulină Progesteron Testosteron Beta-estradiol Hidrocorizon	<b>Acizi nucleici</b> Deoxiadenzină Deoxicitadină Deoxiguanozină Adenzină Citidină Guanozină Timidină Uridină
<b>Antioxidant</b> Acid tiotic	<b>Indicator pH</b> Roșu de fenol	<b>Altu</b> Alcool etilic Tironină
<b>Antibiotic</b> Sulfat de gentamicină	<b>Substraturi energetice</b> Glucoză Piruvat Inozitol	<b>Vitamine și oligoelemente</b> Acid ascorbic Acid folic Nicotinamidă Riboflavină Tiamină Acid pantotenic Cobalamină Piridoxină Biotină
<b>Aminoacid</b> Alanină Arginină Asparagină Acid aspartic Cisteină Acid glutamic Glutamină Glicină Histidină Izoleucină Leucină Lizină Metonină Fenilalanină Prolină Serină Treonină Triptofan Tirozină Valină	<b>Săruri și ioni</b> Clorură de sodiu Selenit de sodiu Clorură de calciu Clorură de colină Clorură de potasiu Fosfat de potasiu Sulfat de magneziu Fosfat de sodiu	<b>Apă</b> Calitate WF1 (water for injection) [apă sterilă pentru injecții]

### 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 rapid CHANG Amnio prin agitare flaconului 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

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

### INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Utilizarea CHANG Amnio pentru culturi primare: Metodologii *in situ*

1. Centrifugați lichidul amniotic la aproximativ 1.200 rpm timp de 10 minute pentru a concentra celulele.
2. 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 acetilcolin-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 suficient CHANG Amnio la soluția de celule concentrată pentru a permite un volum de acoperire final de 0,5 ml per lamelă (în total 4 lamele, în funcție de mărimea peletei de celule) sau 2 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 CO<sub>2</sub> 5%-8%.
4. Inundați culturile în ziua 2 prin adăugarea a 2 ml de CHANG Amnio.
5. După 4 sau 5 zile, culturile trebuie verificate pentru a se vedea dacă există creștere. Odată ce s-a observat creșterea, culturile trebuie hrănite. Hrăniți culturile prin îndepărtarea întregului supernatant al culturii și înlocuirea cu 2 ml CHANG Amnio proaspăt. Se recomandă hrănirea în continuare a culturilor la fiecare 2 zile. Pentru probele care conțin sânge, culturile pot necesita înlocuiri mai frecvente ale mediului.
6. Controlați culturile pentru a vedea dacă există creștere în/sau după ziua 5 și recoltați atunci când se observă suficiente colonii.
7. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când culturile sunt hrănite cu CHANG Amnio în ziua anterioară recoltării.

Utilizarea CHANG Amnio pentru culturi primare: Metodologii cu flacon

1. Centrifugați lichidul amniotic la aproximativ 1.200 rpm timp de 10 minute pentru a concentra celulele.
2. 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 acetilcolin-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 CO<sub>2</sub> 5%-8%.
4. Controlați dacă există creștere în ziua 5. Înlocuiți mediul cu 2 ml de CHANG Amnio proaspăt și recoltați dacă se observă creșterea unui număr suficient de celule.
5. 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.
6. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când culturile sunt hrănite cu CHANG Amnio în ziua anterioară recoltării.

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 și 7,44 (adică mediul trebuie să aibă o culoare ușor galbuie-somon). pH-ul poate fi ajustat cu ușurință punând mediul într-un incubator de 5%-8% CO<sub>2</sub> cu capacul ușor slăbit timp de 30 de minute.

Utilizarea CHANG Amnio pentru disecția CVS:

1. Folosiți un vas Petri de 100 mm X 15 mm împărțit în 2 compartimente și un vas Petri de 60 mm X 15 mm. Transferați 2 ml de mediu (fără ser) în vasul Petri mai mic. Transferați 4 ml din mediu în unul dintre compartimentele vasului Petri mai mare și 6 ml din mediu în celălalt compartiment al aceluiași vas.
2. Aspirați cu atenție mediul și vilii din eprubeta pentru centrifugă inițială care conține proba de la pacientă. Transferați mediul și vilii în compartimentul vasului Petri mai mare, cu 4 ml de mediu de aspirare.
3. Folosind un microscop inversat și două pensete sterile, îndepărtați cheagurile de sânge și orice material din decidua maternă prezent de pe exteriorul vililor chorionici. Aveți grijă să evitați vătămarea vililor fragili.
4. Transferați vilii curățați în compartimentul cu 6 ml al vasului Petri mai mare.
4. Efectuați o curățare finală, folosind penseta pentru a prinde vilii și agitați ușor în timp ce aceștia sunt scufundați în mediu pentru a îndepărta orice fel de decidua în exces, cheaguri de sânge sau detritusuri. Dacă este posibil, alegeți vilii cu ramificații și vene vizibile. Stabiliți cantitatea de vilii prezenți pentru a pregăti numărul optim de culturi (cantitatea ideală pentru utilizarea la o cultură este de 5 mg; nu pregătiți mai mult de 20 mg de vilii).
5. Puneți vilii curățați în vasul Petri mai mic cu 2 ml de mediu (fără ser) folosind o pensetă și transferați apoi vilii și mediul într-o eprubetă pentru centrifugă de 15 ml.

Utilizarea CHANG Amnio pentru culturi primare de CVS

1. Adăugați 4 picături de antibiotic (adică sulfat de gentamicină 50 µg/ml) într-o eprubetă pentru centrifugă și lăsați să stea 30 de minute.
2. Centrifugați vilii la aproximativ 1.400 rpm timp de 5 minute.
3. Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă, lăsând 0,5 ml deasupra peletei de celule (sau cam de 2 ori volumul peletei).
4. Resuspendați ușor peleta. Adăugați 2 ml de mediu CHANG Amnio în eprubeta pentru centrifugă.
5. Repetați pașii 2-3. Adăugați 2 ml de tripsină și incubați cultura fără a o agita timp de 10 minute la 37°C, într-o atmosferă de CO<sub>2</sub> 5%-8%. Scoateți eprubeta din incubator, resuspendați peleta și puneți-o la incubator încă 10 minute.
6. Scoateți eprubeta pentru centrifugă din incubator, resuspendați peleta și centrifugați la 1.400 rpm timp de 8-10 minute.
7. Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă. Resuspendați peleta, apoi adăugați în eprubetă 1 ml de collagenază și puneți la incubator 5 minute.
8. Scoateți din incubator și controlați vizual dacă peleta este turbure și dacă nu se pot vedea bucăți individuale distincte de vilii. Dacă peleta nu este turbure, puneți la loc în incubator încă 5 minute.
9. Repetați pasul 8 până când peleta este curată. Adăugați 3 ml de CHANG Amnio în eprubeta pentru centrifugă pentru a opri acțiunea collagenazei.
10. Centrifugați eprubeta la 1.400 rpm timp de 8-10 minute.
11. Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă, lăsând 0,5 ml deasupra peletei de celule (sau cam de 2 ori volumul peletei). Resuspendați peleta înainte de a adăuga CHANG Amnio folosit pentru pregătire.
12. Pregătiți numărul optim de culturi (aproximativ 1 cultură pentru fiecare 5 mg de vilii utilizați) folosind 0,5 ml

CHANG Amnio per cultură pentru fiecare vas Petri care conține o lamelă.

13. Incubați culturile fără a le agita la 37°C într-o atmosferă de CO<sub>2</sub> 5%-8%.
14. Inundați culturile în ziua 2 prin adăugarea a 1,5 ml de CHANG Amnio.
15. 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 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.
16. Controlați culturile pentru a vedea dacă există creștere în ziua 5 și recoltați atunci când se observă suficiente colonii.
17. 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 AVERTISMENTE

Acest dispozitiv este conceput pentru a fi utilizat de către personal instruit în proceduri care includ întrebuințarea 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. primäroddling av celler i amnionvätska
2. odling av celler från amnionvätska från passage
3. fast amnionvävd från chorionvillibiopsi.

Detta medium har tagits fram för användning i en CO<sub>2</sub>-inkubator (kulturerna ekvibreras i en atmosfär med 5–8 % CO<sub>2</sub>).

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 primäroddling av celler i human amnionvätska (AFC), chorionvillibiopsi (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

<b>Bufferter</b>	<b>Proteiner, hormoner samt tillväxtfaktorer</b>	<b>Nukleinsyror</b>
Natriumbikarbonat	Fetalt bovint serum (FBS)	Deoxiadenosin Deoxicytidin Deoxiguanosin
<b>Antioxidant</b>	Serum från nyfödda kalvar	Adenosin Cytidin Guanosin Tyminidin Uridin
<b>Tioklorsyra</b>		
<b>Antibiotikum</b>	Humant transferrin	<b>Övrigt</b>
Gentamicinsulfat	Fibroblasttillväxtfaktor (FGF)	Etylalkohol Tyronin
<b>Aminosyror</b>	Insulin	<b>Vitaminer och spårämnen</b>
Alanin	Progesteron	Askorbinsyra
Arginin	Testosteron	Folsyra
Asparagin	Betaöstradiol	Nikotinamid
Asparaginsyra	Hydrokortison	Riboflavin
Cystein		Tiamin
Glutaminsyra	<b>pH-indikator</b>	Pantotensyra
Glutamin	Fenolrött	Kobalamin
Glycin	<b>Energisubstrat</b>	Pyridoxin
Histidin	Glukos	Biotin
Isoleucin	Pyruvat	<b>Vatten</b>
Leucin	Inositol	Vatten för injektion (WF1)
Lysin	<b>Salter och ioner</b>	
Metionin	Natriumklorid	
Fenylalanin	Natriumselenit	
Prolin	Kalciumklorid	
Serin	Kolinklorid	
Treonin	Kaliumklorid	
Tryptofan	Kaliumfosfat	
Tyrosin	Magnesiumsulfat	
Valin	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 snabbt genom att snurra 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 primärkultur: *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. Alikvotera 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 cellsuspensionen 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 % CO<sub>2</sub>-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 primärkultur:

#### 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. Alikvotera 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 % CO<sub>2</sub>-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.

Anm: 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 % CO<sub>2</sub>-inkubator med locket något lossat, under cirka 30 minuter.

Användning av CHANG Amnio för dissektion av chorionvillibiopsi:

1. Ta fram en 100 mm X 15 mm petriskål uppdelad i två sektioner, och en 60 mm X 15 mm petriskål. Dispensera 2 ml medium (utan serum) i den mindre petriskålen. Dispensera 4 ml medium i en av sektionerna i den större petriskålen och 6 ml medium i den andra sektionen i samma skål.
2. Aspirera varsamt upp medium och villi från det ursprungliga centrifugröret med patientprovet. Dispensera medium och villi i sektionen med 4 ml aspirationsmedium i den större petriskålen.
3. Använd ett inverterat mikroskop och två sterila pincetter till att avlägsna blodkoagler och eventuell maternell decidua från chorionvillus utsidor. Undvik noga att skada de sköra villi. Överför de rengjorda villi till sektionen med 6 ml i den större petriskålen.
4. Utför en slutför rengöring genom att med en pincett fatta villi och varligt skaka dem medan de är nedsänkta i mediet så att överflödig decidua, blodkoagler och skräp avlägsnas. Välj villi med synliga grenar och vener, om möjligt. Bestäm den föreliggande mängden villi för att preparera det optimala antalet kulturer (5 mg är en idealisk mängd att använda per kultur; preparera inte mer än 20 mg villi).
5. Placera rengjorda villi i den mindre petriskålen med 2 ml medium (utan serum) med hjälp av pincett och överför sedan villi och medium till ett 15 ml centrifugrör.

Användning av CHANG Amnio för primärkultur från chorionvillibiopsi:

1. Tillsätt 4 droppar antibiotikum (dvs. gentamicinsulfat 50 µg/ml) till centrifugröret och låt stå i 30 minuter.
2. Centrifugera villi vid cirka 1 400 rpm under 5 minuter.
3. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar cirka 0,5 ml medium (eller cirka 2 x pelletens volym) ovanför cellpelleten.
4. Resuspendera pelleten försiktigt. Tillsätt 2 ml CHANG Amnio-medium till centrifugröret.
5. Upprepa steg 2–3. Tillsätt 2 ml trypsin och inkubera kulturerna, utan att störa dem, i 10 minuter vid 37 °C i 5–8 % CO<sub>2</sub>-atmosfär. Ta ut röret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och placera röret i inkubatorn i 10 minuter till.
6. Ta ut centrifugröret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och centrifugera i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
7. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret. Resuspendera pelleten, tillsätt därefter 1 ml kollagenas till röret och sätt in röret i inkubatorn i 5 minuter.
8. Ta ut röret ur inkubatorn och se efter om pelleten är grumlig och inga distinkta enskilda stycken av villi kan ses. Om pelleten inte är grumlig, sätt tillbaka röret i inkubatorn i 5 minuter.
9. Upprepa steg 8 tills pelleten är grumlig. Tillsätt 3 ml CHANG Amnio till centrifugröret för att stoppa kollagenasets aktivitet.
10. Centrifugera röret i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
11. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar cirka 0,5 ml medium (eller cirka 2 x pelletens volym) ovanför cellpelleten. Resuspendera pelleten före tillsättning av CHANG Amnio som använts för preparering.
12. Preparera ett optimalt antal kulturer (cirka 1 kultur per 5 mg villi) med användning av 0,5 ml CHANG Amnio per kultur för varje petriskål som innehåller ett täckglas.
13. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 37 °C i 5–8 % CO<sub>2</sub>-atmosfär.
14. Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 1,5 ml CHANG Amnio.
15. Efter 4 dagar bör kulturerna kontrolleras med avseende på växt. Om växt observeras, avlägsna mediet och tillsätt 2 ml färskt CHANG Amnio till varje täckglas. Kulturerna bör därefter tillföras näring varannan dag. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
16. Kontrollera kulturerna med avseende på växt på dag 5 och skörda när tillräckligt många kolonier observeras.
17. 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.

## EESTI KEEL

### NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS

Toodet CHANG Amnio gentamitsiini ja L-glutamiiniga võib kasutada järgmistel eesmärkidel:

1. Lootevedeliku rakkude primaarne kultuurimine
2. Tõstetud lootevedeliku rakkude kasvatamine
3. tahke lootekude koorioni hattude proovist.

See sööde on mõeldud kasutamiseks CO<sub>2</sub> inkubaatorites (5–8% CO<sub>2</sub> keskkonnas tasakaalustatud kultuurid).

pH lõppnäit peab olema 6,65–7,44. Vt kasutusjuhendit.

### SEADME KIRJELDUS

CHANG Amnio on täielik ja kasutusvalmis sööde inimese lootevedeliku rakkude (AFC) primaarseks, koorioni hattude proovide (CVS) ja viljastamistoodete (POC) kultuurimiseks, karüotüüpimise ja muu sünnieelse geneetilise testimise eesmärgil. See on optimeeritud nii rakukasvatuspudelites kui ka *in situ* metodoloogiateks. Sööde sisaldab antibiootikumi gentamitsiinsulfaati (50 µg/ml).

### OSAD

<b>Puhvrid</b>	<b>Valgud, hormoonid ja kasvufaktorid</b>	<b>Nukleiinhapped</b>
Naatrimvesinikkarbonaat	Veiseloote päritolu seerum (FBS)	Deoksüadenosiin
<b>Antiksidant</b>	Vastündindud veise päritolu seerum	Deoksüguanosiin
Lipohape	Inimese transferrin	Adenosiin
<b>Antibiootikum</b>	Fibroplastide kasvufaktor (FGF)	Tsütidin
Gentamitsiinsulfaat	Insuliin	Guanosiin
<b>Aminohape</b>	Progesteron	Tümidin
Alaniin	Testosteroon	Uridiin
Arginiin	Beeta-östradiol	<b>Muu</b>
Asparagiin	Hüdrokortisoon	Etüülalkohol
Asparaginhape		Türooniin
Tsüsteiin	<b>pH-indikaator</b>	<b>Vitamiinid ja mikroelemendid</b>
Glutamiinhape	Fenoolpunane	Askorbiinhape
Glutamiin	<b>Energia substraadid</b>	Foolhape
Glütsiin	Glükoos	Nikotinamiid
Histidiin	Püruvaat	Riboflaviin
Isoleutsiin	Inositool	Tiamiin
Leutsiin	<b>Soolad ja ioonid</b>	Pantoteenhape
Lüsiin	Naatriumkloriid	Kobalamiin
Metioniin	Naatriumseleniit	Püridoksiin
Fenüülalaniin	Kaltsiumkloriid	Biotiin
Proliin	Kaltsiumfosfaat	<b>Vesi</b>
Seriniin	Kaaliumposfaat	WFI kvaliteet
Treoniin	Magneesiumsulfaat	
Triüptofaan	Naatriumposfaat	
Türosiin		
Valiin		

### KVALITEEDI TAGAMINE

#### STERIILSUS

CHANG Amnio tootmisel kasutatav seerum on testitud viraalse saaste suhtes CFR ptk 9 osa 113.53 kohaselt. Samuti on seda testitud mükoplasma suhtes. CHANG Amnio on steriliseeritud filtreerimise teel läbi 0,1 µm filtri. Toote CHANG Amnio proove on võimaliku bakterioloogilise saaste suhtes testitud steriilsuse katseprotokoll järgi, mida on kirjeldatud kehtivas USP steriilsustestis <71>.

### ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

Sulatage CHANG Amnio kiirelt, keerutades pudelit 37 °C veevannis.

CHANG Amnio sisaldab gentamitsiinsulfaati (50 mg/l). Vajaduse korral võib lisada antibiootikume.

#### CHANG Amnio ALIKVOOTIMINE

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.

### KASUTUSJUHEND

Toote CHANG Amnio kasutamine primaarkultuuride korral: *in situ* metodoloogiad

1. Tsentrifugeerige lootevedelikku u 1200 p/min 10 minutit, et rakke kontsentreerida.
2. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupelleti peale u 0,5 ml (või u 2 × pelleti maht)

lootevedelikku. Alikvootige vajaduse korral supernatant (kui võimalik, siis vähemalt 1 ml) alfafetoproteiini (AFP) ja atsetüülkoliinesteraasi analüüsiks. Kui proovis on verd, valmistage lisaaliquoot edasiseks testimiseks ette. Resuspendeerige rakupellet väheses patsiendi enda lootevees. Lisage kontsentreeritud rakususpensioonile piisavalt toodet CHANG Amnio, et igale slaidile oleks võimalik kanda 0,5 ml (kokku 4 slaidi, olenevalt rakupelleti suuruselt) või 2 ml rakukasvatuspudeli kohta. Kui proov on võetud raseduse kolmandas trimestris olevalt patsiendilt, võib pellet olla suurem, kuid sisaldada vähem elujõulisi rakke, nõudes seetõttu tugevamat külvi (tavapärasest vähem söödett).

3. Inkubeerige kultuure segamatult temperatuuril 37 °C 5–8% CO<sub>2</sub> keskkonnas.
4. 2. päeval katke kultuurid üle 2 ml tootega CHANG Amnio.
5. 4–5 päeva järel tuleb kontrollida kultuuride kasvu. Kasvu tuvastamisel tuleb kultuure toita. Toitke kultuure, eemaldades kogu kultuuri supernatandi ja asendades selle 2 ml värsket CHANG Amnioga. Seejärel on soovitatav toita kultuure iga 2 päeva järel. Veriste proovide korral võivad kultuurid vajada sagedasemat söötmevahetust.
6. Kontrollige kultuuride kasvu 5. päeval või pärast seda ning koguge, kui tuvastate piisavad kolooniad.
7. Parimad tulemused saavutatakse kultuuride toitmisel tootega CHANG Amnio üks päev enne kogumist.

Toote CHANG Amnio kasutamine primaarkultuuride korral: Rakupudeli metodoloogiad

1. Tsentrifugeerige lootevedelikku u 1200 p/min 10 minutit, et rakke kontsentreerida.
2. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupelleti peale u 0,5 ml (või u 2 × pelleti maht) lootevedelikku. Alikvootige vajaduse korral supernatant (kui võimalik, siis vähemalt 1 ml) alfafetoproteiini (AFP) ja atsetüülkoliinesteraasi analüüsiks. Kui proovis on verd, valmistage lisaaliquoot edasiseks testimiseks ette. Resuspendeerige rakupellet väheses patsiendi enda lootevees. Lisage 4 ml CHANG Amniot 5 ml pudeli kogumahu kohta. Kui proov on võetud raseduse kolmandas trimestris olevalt patsiendilt, võib pellet olla suurem, kuid sisaldada vähem elujõulisi rakke, nõudes seetõttu tugevamat külvi (tavapärasest vähem söödett).
3. Inkubeerige kultuure segamatult temperatuuril 37 °C 5–8% CO<sub>2</sub> keskkonnas.
4. 5. päeval kontrollige kasvu. Vahetage sööde 2 ml värsket CHANG Amnio vastu ja koguge, kui tuvastate piisava rakukasvu.
5. Kontrollige kultuure kasvu suhtes ja vahetage seejärel sööde iga päev täielikult välja, kuni tuvastate piisavad kolooniad, mis on kogumiseks valmis. Veriste proovide korral võivad kultuurid vajada sagedasemat söötmevahetust.
6. Parimad tulemused saavutatakse kultuuride toitmisel tootega CHANG Amnio üks päev enne kogumist.

Toote CHANG Amnio kasutamine tõstetud lootevedeliku rakkude kasvatamiseks:

rakkude tõstmiseks töödelge kultuure trüpsiiniga (või pronasiga vms) nagu tavapäraselt rakkude kasvatamisel tavalises söötmes. Proteaasiga töötlemist tuleb hoolikalt jälgida. CHANG Amnios kasvatatud lootevedeliku rakud kipuvad olema proteaasitötluse suhtes tundlikumad kui tavapäraselt kasvatatud lootevedeliku rakud. Sellega arvestamiseks tuleb võib-olla muuta protokollid. Märkus. Kultuuride söötamiseks kasutatava söötme pH peab olema vahemikus 6,65–7,44 (st sööde peab olema kergelt kollakasroosa). pH-d on lihtne kohandada, asetades söötme umbes 30 minutiks kergelt lahti keeratud korgiga 5–8% CO<sub>2</sub> inkubaatorisse.

Toote CHANG Amnio kasutamine CVS-i dissektsiooniks

1. Võtke üks 100 mm × 15 mm Petri tass, mis on jagatud 2 osaks, ja üks 60 mm × 15 mm Petri tass. Pange väiksemasse Petri tassi 2 ml söödett (ilma seerumita). Pange 4 ml söödett ühte suure Petri tassi osasse ja 6 ml söödett sama tassi teise osasse.
2. Aspireerige ettevaatlikult sööde ja hatud algsest

tsentrifuugikatsutist, mis sisaldab patsiendi proovi. Viige sööde ja hatud suure Petri tassi sellesse ossa, kus on 4 ml aspireeritud söödett.

3. Kasutades invertmikroskoopi ja kahtesid steriilseid tange, eemaldage verehüübed ja igasugune ema päritolu limaskest, mida näete koorioni hattude välisküljel. Ärge kahjustage hapraid hatte. Viige puhastatud hatud suurema Petri tassi 6 ml osasse.
4. Tehke lõplik puhastus, võtke tangidega hattudest ja liigutage neid õrnalt söötme sees, et eemaldada liigne limaskest, verehüübed ja muud võõrkehad. Võimaluse korral valige nähtavate harude ja veresoontega hatud. Määrake olemasolevate hattude arv, et valmistada ette optimaalne arv kultuure (5 mg on ideaalne kogus ühe kultuuri jaoks; ärge valmistage ette üle 20 mg hatte).
5. Asetage puhastatud hatud tangide abil väiksemasse Petri tassi koos 2 ml söötmega (ilma seerumita) ning viige siis hatud ja sööde 15 ml tsentrifuugikatsutisse.

Toote CHANG Amnio kasutamine CVS-i primaarseteks kultuurideks

1. Lisage 4 tilka antibiootikumi (gentamitsiinsulfaat 50 µg/ml) tsentrifuugikatsutisse ja laske 30 minutit seista.
2. Tsentrifugeerige hatte kiirusel u 1400 p/min 5 minutit.
3. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupelleti peale u 0,5 ml (või u 2 × pelleti maht) söödett.
4. Resuspendeerige pellet õrnalt. Lisage tsentrifuugikatsutisse 2 ml CHANG Amnio söödett.
5. Korrake samme 2–3. Lisage 2 ml trüpsiini ja inkubeerige kultuuri segamatult 37 °C 5–8% CO<sub>2</sub> keskkonnas 10 minutit. Eemaldage Easutite inkubaatorist, resuspendeerige pellet ja asetage veel 10 minutiks inkubaatorisse.
6. Võtke tsentrifuugikatsuti inkubaatorist, resuspendeerige pellet ja tsentrifuugeerige 8–10 minutit 1400 p/min.
7. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant. Resuspendeerige pellet, lisage katsutisse 1 ml kollageenaasi ja asetage 5 minutiks inkubaatorisse.
8. Võtke inkubaatorist välja ja vaadake üle, kas pellet on hägune ning hatud eristuvad osi ei ole näha. Kui pellet ei ole hägune, pange veel 5 minutiks inkubaatorisse.
9. Korrake sammu 8, kuni pellet on hägune. Lisage tsentrifuugikatsutisse 3 ml CHANG Amniot, et lõpetada kollageenaasi toime.
10. Tsentrifugeerige katsutit 8–10 minutit 1400 p/min.
11. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupelleti peale u 0,5 ml (või u 2 × pelleti maht) söödett. Resuspendeerige pellet ja lisage siis ettevalmistamisel kasutatud CHANG Amnio.
12. Valmistage ette optimaalne arv kultuure (u 1 kultuur iga 5 mg hatte kohta), kasutades 0,5 ml CHANG Amniot kultuuri kohta igas Petri tass, milles on slaid.
13. Inkubeerige kultuure segamatult temperatuuril 37 °C 5–8% CO<sub>2</sub> keskkonnas.
14. 2. päeval katke kultuurid 1,5 ml tootega CHANG Amnio.
15. 4 päeva järel tuleb kontrollida kultuuride kasvu. Kasvu tuvastamisel eemaldage sööde ja lisage igale slaidile 2 ml värsket CHANG Amnio't. Seejärel toitke kultuure iga 2 päeva järel. Veriste proovide korral võivad kultuurid vajada sagedasemat söötmevahetust.
16. Kontrollige kultuuride kasvu 5. päeval ning koguge, kui tuvastate piisavad kolooniad.
17. Parimad tulemused saavutatakse kultuuride toitmisel tootega CHANG Amnio üks päev enne kogumist.

### SÄILITAMINE JA STABIILSUS

Hoida temperatuuril alla –10 °C. Toode on külmutatult stabiilne pudeli etiketile märgitud kuupäevani. Kasutamata toote võib jagada tööaliquootidesse ja külmutada uuesti hilisemaks kasutamiseks või tihedalt korkida ja hoida temperatuuril 2–8 °C kuni 30 päeva; seda võib uuesti külmutada kuni kaks korda. Kaitske fluorestentsvalguse eest.

### ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED

See seade on ette nähtud kasutamiseks tervishoiutöötajatele, kes on saanud koolituse selle seadme sihtotstarbelise kasutamise alal. Ärge kasutage ühtegi pudelit, mille steriilne pakend on kahjustunud. Ärge kasutage toodet CHANG Amnio pärast toote etiketil näidatud aegumiskuupäeva.

## MAGYAR

### FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

A gentamicinnel és L-glutaminnal kiegészített CHANG Amnio a következőkre használható:

- az amniotikus folyadék sejtjeinek elsődleges tenyésztése;
- az amniotikus folyadék passzált sejtjeinek növesztése;
- szilárd amnionszövet mintavételezése chorionbolyhokból.

Ezt a médiumot CO<sub>2</sub>-inkubátorokban (5–8%-os CO<sub>2</sub>-atmoszférával ekvibrált tenyészetek) történő használatra tervezték.

A végső pH-értéknek 6,65 és 7,44 között kell lennie. Lásd a használati utasítást.

### TERMÉKISMERTETÉS

A CHANG Amnio egy teljes, azonnal használható médium a humán amniotikus folyadék sejtjeinek (amniotic fluid cells, AFC), a chorionbolyho-mintáknak (chorionic villus sampling, CVS) és a fogamzás termékeinek (products of conception, POC) elsődleges tenyésztéséhez, a kariotípus meghatározásához és más prenatalis genetikai vizsgálatokhoz. Flaska és in situ módszerekhez is optimalizálták. A termék gentamicin-szulfát antibiotikumot (50 µg/ml) tartalmaz.

### ÖSZTETEVŐK

<b>Pufferek</b> Nátrium-bikarbonát	<b>Fehérjék, hormonok és növekedési faktorok</b> Magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS) Újszülött szarvasmarha szérum (neonatal calf serum, NCS) Humán transferrin Tesztoszteron Béta-ösztradiol Hidrokortizon	<b>Kálium-klorid</b> Kálium-foszfát Magnézium-szulfát Nátrium-foszfát
<b>Antioxidáns</b> Tiotiánsav	<b>Magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum, FBS)</b> Újszülött szarvasmarha szérum (neonatal calf serum, NCS) Humán transferrin Tesztoszteron Béta-ösztradiol Hidrokortizon	<b>Nukleinsavak</b> Dezoxi-adenozin Dezoxi-citidin Dezoxi-guanozin Adenozin Citidin Guanozin Timidin Uridin
<b>Antibiotikum</b> Gentamicin-szulfát	<b>pH-indikátor</b> Fenolvörös	<b>Egyéb</b> Etil-alkohol Tironin
<b>Aminosav</b> Alanin Arginin Aszparagin Aszparaginsav Cisztein Glutaminsav Glutamin Glicin Hisztidin Izoleucin Leucin Lizin Metionin Fenilalanin Prolin Szerin Treonin Triptofán Tirozin Valin	<b>Energiaszubsztrátok</b> Glükóz Piruvát Inozitol	<b>Vitaminok és nyomelemek</b> Folsav Nikotinamid Riboflavin Tiamin Pantoténsav Kobalamin Pridoxin Biotin
	<b>Sók és ionok</b> Nátrium-klorid Nátrium-szelenit Kalcium-klorid Kolin-klorid	<b>Víz</b> Injekcióhoz való minőségű víz

### MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

#### STERILITÁS

A CHANG Amnio előállításához használt szérum vírusszennyeződését a CFR 9. címének 113.53 része szerint vizsgálták. A médium mikoplazma-szennyeződését is megvizsgálták. A CHANG Amnio sterilizálása 0,1 mikronos szűrőn át történő szűrőssel történt. A CHANG Amnio mintáit a jelenlegi Amerikai Gyógyszerkönyv sterilitási vizsgálatában <71> leírt sterilításvizsgálati protokollt követve tesztelik a lehetséges bakteriológiai szennyeződésre.

### ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

Olvassa fel gyorsan a médiumot az üveg 37 °C-os vízfürdőben történő forgatásával.

A CHANG Amnio gentamicint (50 mg/ml) tartalmaz. Szükség esetén további antibiotikumokat is hozzáadhat.

#### A CHANG Amnio SZÉTOSZTÁSA

- Olvassa fel a CHANG Amnio médiumot a fenti utasítások szerint.
- Aszeptikusan ossza a kívánt méretű alikvotokra, és fagyassza le újra.

- Olvassa fel az alikvotokat 37 °C-os vízfürdőben, amikor a felhasználásukra készen áll.

### HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A CHANG Amnio felhasználása elsődleges tenyésztéshez: *In situ* módszerek

- Centrifugálja az amniotikus folyadékot körülbelül 1200 rpm-mel 10 percig a sejtek koncentrálásához.
- Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml-t hagyva a centrifugált amniotikus folyadék sejtperlele felett (vagy körülbelül a pellet térfogatának 2-szeresét). Szükség esetén ossza szét a felülúszót (legalább 1 ml, ha lehetséges) az alfa-fetoprotein (AFP) és az acetilkolin-észteráz vizsgálatokhoz. Ha a minta véres, készítsen még egy alikvotot a további vizsgálatokhoz. Szuszpendálja fel újra a sejtperleletet a beteg saját amniotikus folyadékának kis mennyiségében. Adjon elegendő CHANG Amnio médiumot a koncentrált sejtuszuspenzióhoz úgy, hogy a végső szélesztési térfogat fedőlemezenként 0,5 ml (összesen 4 fedőlemez, a sejtperlet méretétől függően) vagy flaskánként 2 ml legyen. Ha a minta a terhesség harmadik trimeszterében lévő betegőtől származik, akkor a pellet nagyobb lehet, de kevesebb életképes sejteket tartalmaz, így nagyobb oltásra van szükség (a normálisnál kevesebb médium).
- Inkubálja a tenyészeteket zavaratalanul 37 °C-on, 5–8%-os CO<sub>2</sub>-atmoszférában.
- Árassza el a tenyészeteket a 2. napon 2 ml CHANG Amnio hozzáadásával.
- 4–5 nap elteltével ellenőrizni kell a tenyészetek növekedését. A tenyészeteket a növekedés megállapítása után táplálni kell. A tenyészetek táplálásához távolítsa el a tenyészet összes felülúszóját, és helyettesítse 2 ml friss CHANG Amnio médiummal. Javasoljuk, hogy a tenyészeteket ezután 2 naponta táplálja. Véres minták esetén a tenyészetek gyakrabban médiumcserét igényelhetnek.
- Ellenőrizze a tenyészetek növekedését az 5. napon vagy azt követően, és amikor elegendő kolónia figyelhető meg, végezze el az összegyűjtést.
- A legjobb eredmények úgy érhetőek el, ha a tenyészeteket az összegyűjtés előtti napon CHANG Amnio médiummal táplálja.

A CHANG Amnio felhasználása elsődleges tenyésztéshez: Flaska módszerek

- Centrifugálja az amniotikus folyadékot körülbelül 1200 rpm-mel 10 percig a sejtek koncentrálásához.
- Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml-t hagyva a centrifugált amniotikus folyadék sejtperlele felett (vagy körülbelül a pellet térfogatának 2-szeresét). Szükség esetén ossza szét a felülúszót (legalább 1 ml, ha lehetséges) az alfa-fetoprotein (AFP) és az acetilkolin-észteráz vizsgálatokhoz. Ha a minta véres, készítsen még egy alikvotot a további vizsgálatokhoz. Szuszpendálja fel újra a sejtperleletet a beteg saját amniotikus folyadékának kis mennyiségében. Adjon 4 ml CHANG Amnio médiumot a flaskánként 5 ml-es teljes térfogathoz. Ha a minta a terhesség harmadik trimeszterében lévő betegőtől származik, akkor a pellet nagyobb lehet, de kevesebb életképes sejteket tartalmaz, így nagyobb oltásra van szükség (a normálisnál kevesebb médium).
- Inkubálja a tenyészeteket zavaratalanul 37 °C-on, 5–8%-os CO<sub>2</sub>-atmoszférában.
- Ellenőrizze a növekedést az 5. napon. Cserélje ki a médiumot 2 ml friss CHANG Amnio médiumra, és ha elegendő sejt növekedés figyelhető meg, végezze el az összegyűjtést.
- Ellenőrizze a tenyészetek növekedését, és ezt követően cserélje ki teljesen a médiumot minden nap addig, amíg elegendő kolónia nem figyelhető meg és a kolóniák készen nem állnak az összegyűjtésre. Véres minták esetén a tenyészetek gyakrabban médiumcserét igényelhetnek.
- A legjobb eredmények úgy érhetőek el, ha a tenyészeteket az összegyűjtés előtti napon CHANG Amnio médiummal táplálja.

A CHANG Amnio felhasználása az amniotikus folyadék passzált sejtjeinek növesztéséhez:

A sejtek passzálásához kezelje a tenyészeteket tripszinnel (vagy pronázalal sb.), ahogyan tenné abban az esetben, ha a sejtek hagyományos médiumban növekednének. A proteázkezelést azonban gondosan ellenőrizni kell. Az amniotikus folyadék CHANG Amnio médiumban növekvő sejtjei általában érzékenyebbek a proteázkezelésre, mint a hagyományos médiumban növekvő sejtek. Ennek figyelembevételéhez szükséges lehet a protokoll módosítása.

Megjegyzés: A tenyészetek táplálására szolgáló médium pH-értékének 6,65 és 7,44 között kell lennie (azaz a médiumnak enyhén sárgás-lazacszínűnek kell lennie). A pH könnyen beállítható úgy, hogy a médiumot 5–8%-os CO<sub>2</sub>-inkubátorba teszi körülbelül 30 percre, enyhén meglaított kupakkal.

A CHANG Amnio felhasználása a CVS vizsgálatához:

- Vegyen egy 100 mm X 15 mm-es, két részre osztott Petri-csészét, és egy 60 mm X 15 mm-es Petri-csészét. Tegyen 2 ml médiumot (szérum nélkül) a kisebb Petri-csészebe. Tegyen 4 ml médiumot a nagy Petri-csésze egyik részébe, és 6 ml médiumot ugyanazon csésze másik részébe.
- Óvatosan szívja fel a médiumot és a bolyhokat a betegmintát tartalmazó eredeti centrifugacsőből. Tegye a médiumot és a bolyhokat a nagyobb Petri-csésze 4 ml felszívott médiumot tartalmazó részébe.
- Fordított állású mikroszkóp és két steril csipesz segítségével távolítsa el a jelen lévő vérrögöket és anyai deciduát a chorionbolyhok külsejéről. Legyen óvatos, hogy ne károsítsa a törékeny bolyhokat. Tegye át a megtisztított bolyhokat a nagyobb Petri-csésze 6 ml-es részébe.
- Végezze el a végső tisztítást úgy, hogy a csipeszek segítségével megfogja és óvatosan mozgatja a bolyhokat, miközben azok a médiumba merülnek a felesleges decidia, vérrögök vagy törmelékek eltávolítása érdekében. Ha lehetséges, a látható ágakkal és vénákkal rendelkező bolyhokat válassza. Határozza meg a jelen lévő bolyhok mennyiségét az optimális számú tenyészet előkészítéséhez (5 mg a tenyészetenként használt ideális mennyiség; ne dolgozzon 20 mg bolyhnál többel).
- Helyezze a megtisztított bolyhokat a csipesszel a 2 ml médiumot (szérum nélkül) tartalmazó, kisebb Petri-csészebe, majd tegye át a bolyhokat és a médiumot egy 15 ml-es centrifugacsőbe.

A CHANG Amnio felhasználása a CVS elsődleges tenyésztéshez

- Adjon 4 csepp antibiotikumot (pl. gentamicin-szulfát, 50 µg/ml) a centrifugacsőhöz, majd hagyja állni 30 percig.
- Centrifugálja a bolyhokat 5 percig 1400 rpm-en.
- Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml médiumot hagyva a sejtperlelet felett (vagy körülbelül a pellet térfogatának 2-szeresét).
- Szuszpendálja fel újra óvatosan a pelletet. Adjon 2 ml CHANG Amnio médiumot a centrifugacsőhöz.
- Ismételje meg a 2–3. lépést. Adjon hozzá 2 ml tripszint, és inkubálja a tenyészetet 10 percig zavaratalanul 37 °C-on, 5–8%-os CO<sub>2</sub>-atmoszférában. Vegye ki a csövet az inkubátorból, szuszpendálja újra a pelletet, és helyezze inkubátorba újabb 10 percre.
- Vegye ki a centrifugacsövet az inkubátorból, szuszpendálja újra a pelletet, és centrifugálja 8–10 percig 1400 rpm-en.
- Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből. Szuszpendálja fel újra a pelletet, majd adjon 1 ml kollagenáz-t a csőhöz, és helyezze inkubátorba 5 percre.
- Vegye ki az inkubátorból, és szemrevételezéssel ellenőrizze, hogy a pellet zavaros-e, és hogy látható-e különálló bolyhok. Ha a pellet zavaros, akkor helyezze vissza az inkubátorba 5 percre.
- Ismételje meg a 8. lépést addig, amíg a pellet zavaros. Adjon 3 ml CHANG Amnio médiumot a centrifugacsőhöz a kollagenáz működésének leállításához.
- Centrifugálja a csövet 8–10 percig 1400 rpm-en.
- Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml médiumot hagyva a sejtperlet felett (vagy körülbelül a pellet térfogatának 2-szeresét).

Szuszpendálja fel újra a pelletet, mielőtt hozzáadja az előkészítéshez használt CHANG Amnio médiumot.

- Készítse elő a megfelelő számú tenyészetet (kb. 1 tenyészet a felhasznált bolyhok minden 5 mg-jára), tenyészetenként 0,5 ml CHANG Amnio használatával, minden egyes Petri-csészehez, fedőlemezzel együtt.
- Inkubálja a tenyészeteket zavaratalanul 37 °C-on, 5–8%-os CO<sub>2</sub>-atmoszférában.
- Árassza el a tenyészeteket a 2. napon 1,5 ml CHANG Amnio hozzáadásával.
- A 4. napon ellenőrizni kell a tenyészetek növekedését. Megfigyelje a növekedés esetén távolítsa el a médiumot, és adjon 2 ml friss CHANG Amnio médiumot minden egyes fedőlemezhöz. A tenyészeteket ezután 2 naponta táplálja. Véres minták esetén a tenyészetek gyakrabban médiumcserét igényelhetnek.
- Ellenőrizze a tenyészetek növekedését az 5. napon, és amikor elegendő kolónia figyelhető meg, végezze el az összegyűjtést.
- A legjobb eredmények úgy érhetőek el, ha a tenyészeteket az összegyűjtés előtti napon CHANG Amnio médiummal táplálja.

### TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

Fagyaszta, –10 °C alatt tárolja. A termék stabil az üveg címkéjén feltüntetett lejárati időpontig, amennyiben fagyaszta tárolják. A fel nem használt termék munkaalkivotokra osztható, és későbbi használatra újra lefagyasztható, vagy szorosan lezárva 2–8 °C közötti hőmérsékleten, legfeljebb 30 napig tárolható; legfeljebb kétszer fagyasztható le újra. Védje a fluoreszcens fénytől.

### ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTÉSEK

Ezt a terméket azon eljárásokban képzett személyzet általi felhasználásra szánták, amelyek során a termék alkalmazása javallott.

Ne használjon olyan üveget, amelynek a steril csomagolása megsérült.

Ne használja a CHANG Amnio médiumot a címkén feltüntetett lejárati időn túl.

## LIETUVIŲ K.

### NAUDOJIMO INDIKACIJA

Gentamicinu ir L glutamino papildyta „CHANG Amnio“ terpė gali būti naudojama pagal tokią paskirti:

1. amniono skysčio ląstelių pirminei kultūrai;
2. auginant perkeltas amniono skysčio ląsteles;
3. tvirto amniono audiniui, gautam paėmus chorioninių išaugų (gaurelių) mėginus.

Ši terpė buvo sukurta naudoti CO<sub>2</sub> inkubatoriuose (ląstelių kultūros pusiausvyros būsenai pasiekta naudojant 5–8 % CO<sub>2</sub> atmosferą).

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

### ĮTAISO APRAŠYMAS

„CHANG Amnio“ – tai visos sudėties paruošta naudoti terpė, skirta pirminei žmogaus vaisiaus vandenų ląstelių (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).

### SUEDAMOSIOS DALYS

<b>Buferiai</b> Natrio bikarbonatas	<b>Baltymai, hormonai ir augimo faktoriai</b> Jaučio embriono	Magnio sulfatas Natrio fosfatas
<b>Antioksidantas</b> Lipo rūgštis	kraujo serumas (FBS)	<b>Nukleino rūgštys</b> Deoksadenozinas Deoksitidinas
<b>Antibiotikas</b> Gentamicino sulfatas	Jaučio naujagimio kraujo serumas Žmogaus transferinas Fibroblasto augimo faktoriūs (FGF)	Adenozinas Citidinas Guanozinas Timidinas Uridinas
<b>Aminorūgštis</b> Alaninas Argininas Asparaginas Asparto rūgštis Cisteinas Glutamo rūgštis	Insulinas Progesteronas Testosteronas Beta estradiolis Hidroksizonas	<b>Kita</b> Etilo alkoholis Tironinas
Glutaminas Glicinas Histidinas Izoleucinas Leucinas Lizinas Metioninas Fenilalaninas Prolinas Serinas Treoninas Triptofanas Tirozinas Valinas	<b>pH indikatorius</b> Fenolio raudonasis	<b>Vitaminai ir mikroelementai</b> Askorbo rūgštis Folio rūgštis Nikotinamidas Riboflavinas Tiaminas Pantotėninė rūgštis Kobalaminas Piridoksinas Biotinas
	<b>Energetiniai, gliuzistai</b> Glukoazė Piruvatas Inozitolis	<b>Yra vanduo</b> injekcinio vandens kokybė

### KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

#### STERILUMAS

Serumas, naudotas gaminant „CHANG Amnio“ terpę, virusinių užkratų atžvilgiu yra iširtas 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 bakteriologinio užkrėtimo rizikai nustatyti pagal šiuo metu patvirtintą Jungtinių Valstijų farmakopėjos (USP) sterilumo bandymų protokolą <71>.

### PARUOŠIMAS NAUDOTI

Terpė greitai atitirpinkite sukiodami butelį 37 °C vandens vonelėje.

„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 pasirengę naudoti, atšildykite alikvotines dalis 37 °C temperatūros vandens vonelėje.

### NAUDOJIMO NURODYMAI

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas pirminėms kultūroms: *in situ* metodai

1. Vaisiaus vandenis 10 minučių centrifuguokite esant 1200 aps./min koncentruotai ląstelių masei gauti.
2. Nusiurbkite centrifuguotų vaisiaus vandenų supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami apyt. 0,5 ml virš ląstelių 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 ląsteles resuspenduokite nedideliame pačios pacientės vaisiaus vandenų kiekyje. Į koncentruotą ląstelių 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 ląstelių nuosėdų) arba po 2 ml vienam flakonėliui. Jei mėginys paimtas iš pacientės trečiąjį nėštumo trimestrą, ląstelių nuosėdos gali būti didesnės, tačiau jose yra mažiau gyvybingų ląstelių, todėl reikia daugiau pasėti (mažiau terpės nei įprastai).
3. Kultūras netrukdomai inkubokite 37 °C temperatūroje 5 %–8 % CO<sub>2</sub> atmosferoje.
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 ląsteles surinkite.
7. Geriausių rezultatų pasiekiami „CHANG Amnio“ terpė pasėlius maitinant dieną prieš ląstelių surinkimą.

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas pirminėms kultūroms: Kolbos metodologijos

1. Vaisiaus vandenis 10 minučių centrifuguokite esant 1200 aps./min koncentruotai ląstelių masei gauti.
2. Nusiurbkite centrifuguotų vaisiaus vandenų supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami apyt. 0,5 ml virš ląstelių 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 ląsteles resuspenduokite nedideliame pačios pacientės vaisiaus vandenų kiekyje. Įplikite 4 ml „CHANG Amnio“ terpės, kad kiekviename flakone susidarytų bendras 5 ml tūris. Jei mėginys paimtas iš pacientės trečiąjį nėštumo trimestrą, ląstelių nuosėdos gali būti didesnės, tačiau jose yra mažiau gyvybingų ląstelių, todėl reikia daugiau pasėti (mažiau terpės nei įprastai).
3. Kultūras netrukdomai inkubokite 37 °C temperatūroje 5 %–8 % CO<sub>2</sub> atmosferoje.
4. 5-ąją dieną patikrinkite augimą. Terpę pakeiskite 2 ml šviežios „CHANG Amnio“ terpės ir pastebėję pakankamai priaugusių ląstelių 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 pasiekiami „CHANG Amnio“ terpė pasėlius maitinant dieną prieš ląstelių surinkimą.

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

Persėdami ląsteles, kultūras apdorokite tripsinu (arba pronaze ar kt.), kaip kad paprastai darytumėte augindami ląsteles įprastinėje terpėje. Tačiau proteazės procedūrą reikia atidžiai stebėti. „CHANG Amnio“ terpėje augintos vaisiaus vandenų ląstelės turi didesnį polinkį jautriai reaguoti į apdorojamą proteazėmis negu įprastinėje terpėje augintos vaisiaus vandenų ląstelės. Gali prireikti

pakeisti protokolą, kad galėtumėte atsivėlgti į šį faktą. Pastaba. Kultūroms maitinti naudojamos terpės rūgštingumas 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 % CO<sub>2</sub> inkubatoriuje su šiek tiek prasaktu dangteliu.

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas CVS disekcijai:

1. Pasiruoškite vieną 100 mm X 15 mm 2 dalių Petri lėkštelę ir vieną 60 mm X 15 mm Petri lėkštelę. Įlašinkite 2 ml terpės (be serumo) į mažesniąją Petri lėkštelę. Įlašinkite 4 ml terpės į vieną iš didesniosios Petri lėkštelės dalių ir 6 ml terpės – į kitą tos pačios lėkštelės dalį.
2. Atsargiai įsiurbkite terpę ir gaurelius iš pradinio centrifuginio mėgintuvėlio su paciento mėginiu. Įlašinkite terpę ir gaurelius į didesniosios Petri lėkštelės dalį su 4 ml įsiurbtos terpės.
3. Naudodami inversinį mikroskopą ir dvi sterilias žnyples, pašalinkite kraujo krešulius ir motinos atkrintančiosios gimdos plėvės likučius, esančius choriono gaurelių išorėje. Saugokitės, kad nepažeistumėte trapių gaurelių. Perkelkite išvalytus gaurelius į didesniosios Petri lėkštelės 6 ml dalį.
4. Atlikite galutinį valymą, suėmę gaurelius žnyplėmis atsargiai maišydami ir panardinę į terpę, kad pašalintumėte visą atkrintančiąją gimdos plėvę, kraujo krešulius ir likučius. Jei įmanoma, pasirinkite gaurelius su matomomis šakomis ir venomis. Nustatykite esančių gaurelių kiekį, kad galėtumėte paruošti optimalių kultūrų skaičių (vienai kultūrai optimalu naudoti 5 mg; neruoškite daugiau kaip 20 mg gaurelių).
5. Žnyplėmis įdėkite išvalytus gaurelius į mažesniąją Petri lėkštelę su 2 ml terpės (be serumo), o tada perkelkite gaurelius ir terpę į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį.

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas pirminėms CVS kultūroms

1. 30-iai minučių į centrifuginį mėgintuvėlį įlašinkite 4 lašus antibiotiko (t. y. gentamicino sulfato, 50 µg/ml).
2. Centrifuguokite gaurelius 5 minutes esant apyt. 1400 aps./min.
3. Nusiurbkite supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami 0,5 ml terpės virš ląstelių nuosėdų (arba apie 2 k. už nuosėdų tūrį didesnį kiekį).
4. Atsargiai resuspenduokite nuosėdas. Į centrifuginį mėgintuvėlį įplikite 2 ml „CHANG Amnio“ terpės.
5. Pakartokite 2–3 etapus. Įplikite 2 ml tripsino ir kultūrą netrukdomai 10 minučių inkubokite 37 °C temperatūroje 5 %–8 % CO<sub>2</sub> atmosferoje. Išimkite mėgintuvėlį iš inkubatoriaus, resuspenduokite ląstelių nuosėdas ir padėkite į inkubatorių dar 10 minučių.
6. Išimkite centrifuginį mėgintuvėlį iš inkubatoriaus, resuspenduokite ląstelių nuosėdas ir 8–10 minučių centrifuguokite esant 1400 aps./min.
7. Nusiurbkite supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio. Resuspenduokite ląstelių nuosėdas, tada į mėgintuvėlį įplikite 1 ml kolagenazės ir padėkite į inkubatorių 5 minutėms.
8. Išimkite iš inkubatoriaus ir apžiūrėkite, ar ląstelių nuosėdos drumstos ir ar nesimato atskirų gaurelių dalių. Jei ląstelių nuosėdos nedrumstos, padėkite atgal į inkubatorių 5 minutėms.
9. Kartokite 8 etapą, kol ląstelių nuosėdos taps drumstos. Įplikite 3 ml „CHANG Amnio“ terpės į centrifuginį mėgintuvėlį, kad kolagenazė nustotų veikti.
10. Mėgintuvėlį 8–10 minučių centrifuguokite esant 1400 aps./min.
11. Nusiurbkite supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami 0,5 ml terpės virš ląstelių nuosėdų (arba apie 2 k. už nuosėdų tūrį didesnį kiekį). Prieš įplidami paruošti naudotos „CHANG Amnio“ terpės resuspenduokite ląstelių nuosėdas.
12. Paruoškite optimalių kultūrų skaičių (apyt. 1 kultūrą 5-iems mg gaurelių) naudodami 0,5 ml „CHANG Amnio“ terpės vienai kultūrai kiekvienoje Petri lėkštelėje su dengiamuoju stikliu.
13. Kultūras netrukdomai inkubokite 37 °C temperatūroje 5 %–8 % CO<sub>2</sub> atmosferoje.
14. 2-ą dieną ant kultūrų užliekite po 1,5 ml „CHANG Amnio“ terpės.
15. Praėjus 4 dienoms, reikia patikrinti kultūrų augimą. Pastebėję ląstelių augimą, pašalinkite terpę ir po

kiekvienu dengiamuoju stikliu pridėkite 2 ml šviežios „CHANG Amnio“ terpės. Po to kultūras maitinkite kas 2 dienas. Jei mėginiai buvo kraujingi, kultūroms gali prireikti dažniau keisti terpę.

16. 5-ą dieną patikrinkite kultūrų augimą ir aptikę pakankamai kolonijų ląsteles surinkite.

17. Geriausių rezultatų pasiekiami „CHANG Amnio“ terpė pasėlius maitinant dieną prieš ląstelių surinkimą.

### LAIKYMAS IR STABILUMAS

Laikykite užšaldytą –10 °C temperatūroje. Laikant užšaldytą, produktas išlieka stabilus iki tinkamumo datos, pažymėtos butelio etiketėje. Nesunaudotą produkto likutį galima išplistyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti vėlesniai 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-Glutamini 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 CO<sub>2</sub> inkübatörlerinde (%5 - %8 CO<sub>2</sub> atmosferinde dengelenmiş kültürler) kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

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

### CİHAZ TANIMI

CHANG Amnio karyotipleme ve diğer prenatal genetik testlerde kullanılmak üzere insan amniyotik sıvı hücreleri (AFC), koryonik villus örneklemesi (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 <u>Büyüme Faktörleri</u> Fetal siğir serumu (FSS)	Nükleik asitler Deoksadenozin Deoksitidin Deoksiguanozin Adenozin Sitiidin Guanozin Timidin Üridin
<u>Antioksidan</u> Tiyotik asit	Yenidoğan siğir serumu İnsan transferrini Fibroblast büyüme faktörü (FGF) İnsülin	<u>Diğer</u> Etil alkol Tironin
<u>Antibiyotik</u> Gentamisin Sülfat	<u>pH Göstergesi</u> Fenol kırmızısı	<u>Vitaminler ve eser elemanlar</u> Askorbik asit Folik asit Nikotinamid Riboflavin Triyamin Pantotenik asit Kobalamin Piridoksin Biyotin
<u>Amino Asit</u> Alanin Arjinin Asparajin Aspartik Asit Sistein Glutamik Asit Glutamin Glisin Histidin Lösolin Lösin Lizin Metiyonin Fenilalanin Prolin Serin Treonin Triptofan Tirozin Valin	<u>Enerji Substratları</u> Glukoz Piruvat İnositol	<u>Su</u> Enjeksiyonluk Su Kalitesi
	<u>Tuzlar ve İyonlar</u> Sodyum klorür Sodyum selenit Kalsiyum klorür Kolin klorür Potasyum klorür Potasyum fosfat Magnezyum sülfat Sodyum fosfat	

### KALITE 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 sterilite testi protokolü izlenerek olası bakteriyolojik kontaminasyon açısından test edilir.

### KULLANIM HAZIRLIĞI

Ürünü bir 37°C su banyosunda ışıyı çevirerek hızla çözün.

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

#### CHANG Amnio ALİKOTLAMA

- 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 konsantr etmek için amniyotik sıvıyı 10

dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.

- 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. Konsantr hücre süspansiyonuna lamel başına 0,5 mL (hücre pelleti büyüklüğüne bağlı olarak toplam 4 lamel) veya flasket başına 2 mL olacak şekilde son plakalama hacmini mümkün kılmak üzere yeterli CHANG Amnio ekleyin. Numune gebeliğin 3. trimesterindeki bir hastadan alınrsa 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 %5 - %8 CO<sub>2</sub> atmosferi altında inkübe edin.
- Kültürleri gün 2'de 2 mL CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıyla örtün.
- Kültürlerin 4 - 5 günden sonra üreme açısından kontrol edilmesi gerekir. Kültürler üreme gözlemlendikten sonra beslenmelidir. Kültürleri tüm kültür süpernatanı 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 gerekebilir.
- 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 konsantr etmek için amniyotik sıvıyı 10 dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.
- 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 alınrsa 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 %5 - %8 CO<sub>2</sub> atmosferi altında inkübe edin.
- Gün 5'te üreme için kontrol edin. Vasatı 2 mL yeni CHANG Amnio ile değiştirin ve yeterli hücre üremesi gözlenirse toplayın.
- 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.
- 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 kültürleri hücreler geleneksel vasatta üretildiğinde 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 (yani vasat hafif sarımsı pembe olmalıdır). pH değeri vasatı kapağı hafifçe gevşetilmiş olarak yaklaşık 30 dakika boyunca bir %5 - %8 CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirerek kolayca ayarlanabilir.

#### CVS diseksiyonu için CHANG Amnio kullanımı:

- İki bölmeye bölünmüş bir 100 mm X 15 mm petri tabağı ve bir 60 mm X 15 mm petri tabağı alın. Daha küçük petri tabağına 2 mL vasat (serumsuz) verin. Büyük petri tabağının bir bölümüne 4 mL vasat ve aynı tabağın diğer bölümüne 6 mL vasat verin.
- Hasta örneğini içeren orijinal santrifüj tüpünden vasat ve villusları dikkatle aspire edin. Vasatı ve villusları büyük petri tabağı bölümüne 4 mL aspirasyon vasatıyla verin.
- Bir inverted mikroskop ve iki steril forseps kullanarak koryonik villusun dış kısmından mevcut herhangi bir maternal desidua ve kan pıhtılarını giderin. Narin villuslara zarar vermektten kaçınmak için dikkatli olun. Temizlenmiş villusları büyük petri tabağının 6 mL bölümüne aktarın.
- Herhangi bir fazla desidua, kan pıhtıları veya kalıntıları gidermek için villusların vasata batmış durumdayken tutulup hafifçe ajitasyonu için forseps kullanarak son bir temizlik yapın. Mümkünse görünür dalları ve damarları olan villuslar seçin. Optimum kültür sayısını hazırlamak için mevcut villus sayısını belirleyin (kültür başına kullanmak üzere ideal miktar 5 mg'dır; 20 mg üzerinde villus kullanmayın).
- Temizlenmiş villusları forseps kullanarak 2 mL vasat (serumsuz) bulunan daha küçük petri tabağına koyun ve sonra villuslar ve vasatı bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın.

#### Primer CVS Kültürleri için CHANG Amnio Kullanımı

- Santrifüj tüpüne 4 damla antibiyotik (Gentamisin Sülfat, 50 µg/mL) ekleyin ve 30 dakika boyunca bekletin.
- Villusları 5 dakika boyunca yaklaşık 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.
- Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) vasat bırakın.
- Pelleti yavaşça tekrar süspansiyon haline getirin. Santrifüj tüpüne 2 mL CHANG Amnio vasatı ekleyin.
- 2 - 3. adımları tekrarlayın. 2 mL tripsin ekleyin ve kültürü bozulmadan 10 dakika boyunca 37°C, %5 - %8 CO<sub>2</sub> 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 santrifüjleyin.
- Süpernatanı santrifüjlenmiş tüpten aspire edin. Pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve sonra tüpe 1 mL kollajenaz ekleyip 5 dakikalığına inkübatöre koyun.
- Inkübatörden çıkarın ve pelletin bulanık olup olmadığını ve ayrı tek tek villus parçalarının görülemediğini görsel olarak doğrulayın. Pellet bulanık değilse 5 dakikalığına tekrar inkübatöre koyun.
8. adımı pellet bulanık hale gelinceye kadar tekrarlayın. Kollajenaz etkisini durdurmak için santrifüj tüpüne 3 mL CHANG Amnio ekleyin.
- Tüpü 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.
- Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) vasat bırakın. Kurulum için kullanılan CHANG Amnio eklemeyen önce pelleti süspansiyon haline getirin.
- Bir lamel içeren her petri tabağı için kültür başına 0,5 mL CHANG Amnio kullanarak optimum sayıda kültürü kurun (yaklaşık olarak kullanılan her 5 mg villus için 1 kültür).
- Kültürleri ellemeden 37°C %5 - %8 CO<sub>2</sub> atmosferi altında inkübe edin.
- Kültürleri gün 2'de 1,5 mL CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıyla örtün.
4. günde kültürler üreme açısından kontrol edilmelidir. Üreme gözlenirse vasatı alın ve her lamele 2 mL yeni 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 son kullanma tarihine kadar stabildir. Kullanılmamış ürün çalışma alikotlarına aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere tekrar dondurulabilir veya kapağı 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 eğitilmiş personelce kullanılması amaçlanmıştır. Steril ambalajın olumsuz etkilediği herhangi bir şeyeyi kullanmayın.

CHANG Amnio ürününü etikette belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

## 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 CO<sub>2</sub> (kultúrach ustálených s atmosférou 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>).

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 prenatalných genetických testoch. Je optimalizovaný pre metódy fliašiek aj in situ. Tento produkt obsahuje antibiotikum gentamicínsulfát (50 µg/ml).

### ZLOŽKY

<b>Pufre</b> hydrogénuhlíčitán sodný	<b>Bielkoviny, hormóny</b> a rastové faktory fetálne bovinné sérum (FBS)	síran horečnatý fosfát sodný
<b>Antioxidant</b> kyselina tioktová	neonatálne bovinné sérum	<b>Nukleové kyseliny</b> deoxyadenozín deoxycytidín deoxyguanozín
<b>Antibiotikum</b> gentamicínsulfát	ľudský transferín fibroblastový rastový faktor (FGF)	adenozín cytidín guanozín tymidín uridín
<b>Aminokyseliny</b> alanín arginín asparagín kyselina asparágová cysteín kyselina glutámová glutamín glycín histidín izoleucín leucín lyzín metionín fenylalanín prolín serín treonín tryptofán tyrozín valín	inzulín progesterón testosterón beta estradiol hydrokortizón	<b>Iné</b> etylalkohol tyronín
	<b>Indikátor pH</b> fenolová červená	<b>Vitamíny</b> a stopové prvky kyselina askorbová kyselina listová nikotínamid riboflavín tiamín kyselina pantoténová kobalamín pyridoxín biotín
	<b>Energetické</b> substráty glukóza pyruvát inositol	<b>Voda</b> kvalita vody na injekciu
	<b>Soli a ióny</b> chlorid sodný seleničitan sodný chlorid vápenatý cholin vápenatý chlorid draselný fosforečnan draselný	

### 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 mykoplasmatických kontamináciu. CHANG Amnio je sterilizované filtráciou cez 0,1-mikróvny 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

CHANG Amnio rýchlo rozmrazte vireni fľaše vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C.

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

#### ALIKVOTOVANIE 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: Metodiky *in situ*

1. Plodovú 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 bunkovú peletu (alebo 2x objem pelety) odstredenej plodovej vody. Podľa potreby alikvotujte supernatant (najmenej 1 ml, ak je to možné), na analýzu alfafetoproteínu (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 sklíčko (celkom 4 krycie sklíčka, podľa veľkosti bunkovej pelety) alebo 2 ml na každú fľaštičku. 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 % CO<sub>2</sub>.
4. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 2 ml CHANG Amnio.
5. Po 4 až 5 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Kultúry treba prívitiť, keď sa spozoruje rast. Kultúry prívite odstránením všetkého supernatantu kultúry a pridaním 2 ml čerstvého CHANG Amnio. Potom sa odporúča kultúry prívitiť 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 dostatočnú kolóniu.
7. Najlepšie výsledky sa dosiahnu, keď sú kultúry prívitené CHANG Amnio deň pred zberom.

CHANG Amnio použite na primárne kultúry: Metodiky fľaštičiek

1. Plodovú 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 bunkovú peletu (alebo 2x objem pelety) odstredenej plodovej vody. Podľa potreby alikvotujte supernatant (najmenej 1 ml, ak je to možné), na analýzu alfafetoproteínu (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 fľaštičku. 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 % CO<sub>2</sub>.
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 dostatočnú kolóniu a nie sú pripravené na zber. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
6. Najlepšie výsledky sa dosiahnu, keď sú kultúry prívitené CHANG Amnio deň pred zberom.

Použitie CHANG Amnio na rast pasážovaných buniek plodovej vody:

Na pasážovanie buniek ošetríte kultúry trypsínom (alebo pronázou atď.) ako obvykle, keď sa bunky pestujú v konvenčnom médiu. Ošetrovanie pronázou však treba pozorne sledovať. Bunky plodovej vody vypestované v CHANG Amnio sú zvyčajne citlivejšie na ošetrovanie pronázou, než keď sú vypestované 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 vložením média do inkubátora s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub> s mierne uvoľneným vrchnákom na asi 30 minút.

CHANG Amnio použite na disekciu CVS:

1. Zaoštarajte jeden 100 mm x 15 mm Petriho miskú rozdelenú na 2 oddiely a jednu 60 mm x 15 mm Petriho miskú. Do menšej Petriho misky nadávkuje 2 ml média

(bez séra). Do jedného oddielu väčšej Petriho misky nadávkuje 4 ml média a do druhého oddielu tej istej misky 6 ml média.

2. Médium a kľky opatrne aspirujte z pôvodnej skúmavky na odstredovanie obsahujúcej vzorku pacientky. Médium a kľky nadávkuje do oddielu väčšej Petriho misky so 4 ml aspiračného média.
3. Pomocou inverzného mikroskopu a dvoch sterilných pinziet odstráňte krvné zrazeniny a všetku materskú deciduu prítomnú z vonkajšej strany chorionických klkov. Dajte pozor, aby ste nepoškodili krehké kľky. Očistené alebo odpad. Ak je to možné, vyberajte kľky s viditeľnými vetvami a žilami. Stanovte množstvo klkov potrebných pre optimálny počet kultúr (5 mg je ideálny počet na použitie na jednu kultúru, nepripravujte viac než 20 mg klkov).
5. Očistené kľky vložte do menšej Petriho misky s 2 ml média (bez séra) pomocou pinzety a potom kľky a médium preneste do 15 ml skúmavky na odstredovanie.

Použitie CHANG Amnio na primárne kultúry CVS

1. Do skúmavky na odstredovanie pridajte 4 kvapky antibiotika (napríklad gentamicínsulfát, 50 µg/ml) a nechajte postáť 30 minút.
2. Kľky odstreďujte pri 1 400 otáčok za minútu 5 minút.
3. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovú peletu (alebo 2x objem pelety).
4. Peletu jemne resuspendujte. Do skúmavky na odstredovanie pridajte 2 ml média CHANG Amnio.
5. Zopakujte kroky 2 – 3. Pridajte 2 ml trypsínu a nerušené kultúry inkubujte pri teplote 37 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO<sub>2</sub> 10 minút. Skúmavku vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a vložte ju do inkubátora na ďalších 10 minút.
6. Skúmavku na odstredovanie vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a odstreďte ju 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
7. Z odstredenej skúmavky aspirujte supernatant. Peletu resuspendujte, potom do skúmavky pridajte 1 ml kolagenázy a vložte ju do inkubátora na 5 minút.
8. Vyberte z inkubátora a zrakom skontrolujte, či peleta nie je zakalená a či nie je vidieť zjavné jednotlivé kusy klkov. Ak peleta nie je zakalená, vložte ju naspäť do inkubátora na 5 minút.
9. Kroky 8 opakujte dovtedy, kým peleta nie je zakalená. Pridajte 3 ml CHANG Amnio do skúmavky na odstredovanie, aby sa zastavilo pôsobenie kolagenázy.
10. Skúmavku odstreďte 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
11. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovú peletu (alebo 2x objem pelety). Peletu resuspendujte skôr, než pridáte CHANG Amnio použité na prípravu.
12. Pripravte optimálny počet kultúr (približne 1 kultúru na každých 5 mg použitých klkov) s použitím 0,5 ml CHANG Amnio na každú kultúru pre každú Petriho miskú obsahujúcu krycie sklíčko.
13. Nerušené kultúry inkubujte pri teplote 37 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
14. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 1,5 ml CHANG Amnio.
15. Po 4 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Ak pozorujete rast, odstráňte médium a pridajte 2 ml čerstvého CHANG Amnio na každé krycie sklíčko. Potom sa majú kultúry prívitiť každé 2 dni. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
16. Rast na kultúrach skontrolujte okolo 5. dňa a vykonajte zber, keď spozorujete dostatočnú kolóniu.
17. Najlepšie výsledky sa dosiahnu, keď sú kultúry prívitené CHANG Amnio deň pred zberom.

### UCHOVÁVANIE A STABILITA

Uchovávajte zmrazené pri teplote pod -10 °C. Produkt bude stabilný až do dátumu expirácie na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazený. Nepoužitý produkt možno nadávkať 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.

## БЪЛГАРСКИ

### ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

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

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

Тази среда е предназначена за използване в CO<sub>2</sub> инкубатори (култури, еквилибрирани с 5% – 8% CO<sub>2</sub> 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 хорсионни въси (CVS) и продукти за зачеване (POC) за използване в кариотипизиране 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

<b>Буфери</b> Натриев бикарбонат	<b>Протеини, хормони и растежни фактори</b> Фетален говежди серум (FBS) Говежди серум на новородено Човешки трансферин Фибробластен растежен фактор	<b>Нуклеинови киселини</b> Дезоксиаденозин Дезоксицитидин Дезоксигуанозин Аденозин Цитидин Гуанозин Тимидин Уридин
<b>Антиоксидант</b> Тиоктова киселина	<b>рН индикатор</b> Фенол, червен	<b>Други</b> Етилов алкохол Тиронин
<b>Антибиотик</b> Гентамицин сулфат	<b>Енергийни субстрати</b> Глюкоза Пируват Инозитол	<b>Витамини и микроелементи</b> Аскорбинова киселина Фолиева киселина Никотинамид Рибофлавин Тиамин Пантотенова киселина Кобаламин Пиридоксин Биотин
<b>Аминокиселина</b> Аланин Аргинин Аспарагин Аспарагинова киселина Цистеин Глутаминова киселина Глутамин Глицин Хистидин Изолевцин Левцин Лизин Метионин Фенилаланин Пролин Серин Треонин Триптофан Тирозин Валин	<b>Соли и йони</b> Натриев хлорид Натриев селенит Калциев хлорид Холин хлорид Калиев хлорид Калиев фосфат Магнезиев сулфат Натриев фосфат	<b>Вода</b> 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 бързо, като разклащате с кръгови движения бутилката във водна баня с температура 37° C.

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

### АЛИКВОТИРАНЕ НА CHANG Amnio

1. Размразете CHANG Amnio съгласно инструкциите 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 грм 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-фетопропротеин (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесиментът съдържа кръв, пригответе допълнителна аликвотна част за последващо тестване. Ресуспендирайте пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата) центрофугирана 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 спесиментът 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 засаждање (по-малко среда от нормалното).
3. Инкубирате културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO<sub>2</sub> 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 заменете 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 грм 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-фетопропротеин (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесиментът 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 спесиментът 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 засаждање (по-малко среда от нормалното).
3. Инкубирате културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO<sub>2</sub> 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. Третирането 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 запазване на културите, трябва да е между 6,65 – 7,44 (т.е. средата трябва да е с леко жълтеникаво-розово-оранжево цвят). Нивото на pH може лесно да се регулира чрез поставяне на средата в 5% – 8% CO<sub>2</sub> инкубатор с леко разхлабена капачка за около 30 минути.

Използване на CHANG Amnio за дисекция на CVS (проба на хорсионни въси):

1. Пригответе едно блюдо на Петри, 100 mm X 15 mm, разделено на 2 части, и едно блюдо на Петри, 60 mm X 15 mm. Накапете 2 ml среда (без серум) в по-малкото блюдо на Петри. Накапете 4 ml среда в едната част на голямото блюдо на Петри и 6 ml среда в другата част на същото блюдо.
2. Внимателно аспирирайте среда и въси от оригиналната центрофужна епруветка, съдържаща пробата на пациента. Накапете среда и въси в частта на голямото блюдо на Петри с 4 ml среда на аспириране.
3. С помощта на инвертиран микроскоп и две стерилни пинцети отстранете кръвните съсиреци и всякакъв материал от маточна лигавица, налични от външната страна на хорсионните въси. Внимавайте да не увредите крехките въси. Прехвърлете почистените въси в частта с 6 ml на голямото блюдо на Петри.
4. Изпълнете окончателно почистване с помощта на пинцета, като хванете въсите и ги раздвижете внимателно, докато са потопени в средата, за да отстраните всякакъв излишен материал от маточна лигавица, кръвни съсиреци или остатъци. Изберете въси с видими разклонения и вени, ако е възможно. Определете количеството налични въси, за да пригответе оптималния брой култури (5 mg е идеално количество за използване за една култура; не пригответе повече от 20 mg въси).
5. Поставете почистените въси в по-малко блюдо на Петри с 2 ml среда (без серум) с помощта на пинцети и след това прехвърлете въсите и средата в центрофужна епруветка от 15 ml.

Използване на CHANG Amnio за първични култури на CVS

1. Добавете 4 капки антибиотик (напр. гентамицин сулфат, 50 µg/ml) в центрофужната епруветка и оставете да престои за 30 минути.
2. Центрофугируйте въсите при приблизително 1400 грм за 5 минути.
3. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки 0,5 ml среда над пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата).
4. Внимателно ресуспендирайте пелетата. Добавете 2 ml среда CHANG Amnio към центрофужната епруветка.
5. Повторете стъпки 2 – 3. Добавете 2 ml трипсин и инкубирате културата в покой при 37° C, 5% – 8% CO<sub>2</sub> атмосфера за 10 минути. Отстранете епруветката от инкубатора, ресуспендирайте пелетата и поставете в инкубатор за още 10 минути.
6. Отстранете центрофужната епруветка от инкубатора, ресуспендирайте пелетата и центрофугируйте за 8 – 10 минути при 1400 грм.
7. Аспирирайте супернатанта от центрофужната

епруветка. Ресуспендирайте пелетата, след това добавете 1 ml колагеназа към епруветката и поставете в инкубатор за 5 минути.

8. Отстранете от инкубатора и визуално проверете дали пелетата е мътна и не могат да се видят отделни части от въсите. Ако пелетата не е мътна, поставете я отново в инкубатора за 5 минути.
9. Повтаряйте стъпка 8, докато пелетата помътнее. Добавете 3 ml CHANG Amnio към центрофужната епруветка, за да спрете действието на колагеназата.
10. Центрофугируйте епруветката за 8 – 10 минути при 1400 грм.
11. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки 0,5 ml среда над пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата). Ресуспендирайте пелетата преди добавяне на CHANG Amnio, използвана за приготвяне.
12. Пригответе оптимален брой култури (приблизително 1 култура на всеки 5 mg използвани въси), използвайки 0,5 ml CHANG Amnio на култура за всяко блюдо на Петри, съдържащо покривно стъкло.
13. Инкубирате културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO<sub>2</sub> атмосфера.
14. В ден 2 залейте културите, като добавите 1,5 ml CHANG Amnio.
15. На 4 дни културите трябва да се проверяват за растеж. Ако се наблюдава растеж, отстранете среда и добавете 2 ml прясна 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.
16. Проверете културите за растеж в ден 5 и съберете, когато се наблюдават достатъчно колонии.
17. 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 етикетата 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 етикетата.



## HRVATSKI

### INDIKACIJE ZA UPOTREBU

CHANG Amnio s gentamicinom i L-glutaminom može se upotrebljavati za sljedeće primjene:

1. primarnu kulturu stanica amnijske tekućine
2. uzgoj supkultiviranih stanica amnijske tekućine
3. kruto amnijsko tkivo dobiveno biopsijom korionskih resica.

Ovaj medij osmišljen je za upotrebu u CO<sub>2</sub> inkubatorima (kulture uravnotežene atmosferom s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>).

Završna pH vrijednost mora biti 6,65 – 7,44. Više pojedinosti potražite u Uputama za upotrebu.

### OPIS PROIZVODA

CHANG Amnio cjelokupan je medij koji je spreman za upotrebu za uzgoj primarne kulture stanica ljudske amnijske tekućine (AFC), uzorkovanja korionskih resica (CVS) i proizvoda začeca (POC) u svrhu kariotipizacije i drugih prenatalnih genetičkih testiranja. Optimiran je za metode u tkivici i *in situ*. Ovaj proizvod sadrži antibiotik gentamicinsulfat (50 µg/ml).

### KOMPONENTE

<b>Puferi</b>	<b>Proteinski hormoni</b>	<b>Nukleinske kiseline</b>
Natrijev	<b>čimbenici rasta</b>	Deoksiadenozin
hidrogenkarbonat	Fetalni govedji serum (FBS)	Deoksicitidin
	Serum novorođene teladi	Deoksigvanozin
<b>Antioksidans</b>	Humani transferin	Adenozin
Lipoična kiselina	Fibroblastni	Citidin
	čimbenik rasta	Gvanozin
<b>Antibiotik</b>	(FGF)	Timidin
Gentamicinsulfat	Inzulin	Uridin
	Progesteron	<b>Ostalo</b>
<b>Aminokiselina</b>	Arginin	Etilni alkohol
Alanin	Asparagin	Tironin
Arginin	Aspartatna kiselina	
Asparagin	Cistein	<b>Vitamini i elementi u tragovima</b>
Aspartatna kiselina	Glutamnatna kiselina	Askorbinska kiselina
Cistein	Glutamin	Folna kiselina
Glutamnatna kiselina	Glicin	Nikotinamid
Glutamin	Histidin	Glukoza
Glicin	<b>Energetski supstrati</b>	Riboflavin
Histidin	Glukoza	Tijamin
Izoleucin	Leucin	Pantotenska kiselina
Leucin	Lizin	Kobalamin
Lizin	Metionin	Piridoksin
Metionin	Fenilalanin	Biotin
Fenilalanin	<b>Soli i ioni</b>	
Prolin	Natrijev klorid	<b>Voda</b>
Serin	Natrijev selenit	Kvaliteta u skladu s propisanošću za vodu za injekcije
Treonin	Kalcijev klorid	
Triptofan	Kolinijev klorid	
Tirozin	Kalijev klorid	
Valin	Kalijev fosfat	
	Magnezijev sulfat	
	Natrijev fosfat	

### OSIGURANJE KVALITETE

#### STERILNOST

Serum koji se koristi za proizvodnju proizvoda CHANG Amnio testiran je na kontaminaciju virusima u skladu sa Zakonomo saveznih propisa SAD-a (CFR), Glava 9., dio 113.53. Uz to, testiran je i na kontaminaciju mikoplazmom. CHANG Amnio steriliziran je filtracijom kroz filter od 0,1 mikron. Uzorci proizvoda CHANG Amnio testirani su na moguću bakteriološku kontaminaciju nakon provedbe protokola testiranja sterilnosti koji je opisan u važećem testu sterilnosti u skladu s Farmakopejom Sjedinjenih Američkih Država, USP <71>.

### PRIPREMA ZA UPOTREBU

Brzo odmrznuti mučkajući bocu u vodenoj kupelji temperiranoj na 37 °C.

CHANG Amnio sadrži gentamicin (50 mg/l). Po želji se mogu dodati dodatni antibiotici.

#### ALIKVOTIRANJE PROIZVODA CHANG Amnio

1. Odmrznuti CHANG Amnio u skladu s prethodno navedenim uputama.
2. Aseptički raspodijeliti u alikvot odgovarajućih veličina i ponovno zamrznuti.
3. Odmrznuti alikvot u vodenoj kupelji temperiranoj na 37 °C kada ih želite upotrijebiti.

### UPUTE ZA UPOTREBU

Upotreba proizvoda CHANG Amnio za primarne kulture: metode *in situ*

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 pacijentične vlastite amnijske tekućine. Dodati odgovarajuću količinu proizvoda CHANG Amnio koncentriranoj suspenziji stanica kako bi se postigao konačan volumen nasadivanja od 0,5 ml po pokrovnom stakalcu (ukupno 4 pokrovna stakalca, ovisno o veličini taloga stanica) ili od 2 ml po bočici za kulturu. Ako je uzorak prikupljen od pacijentice u trećem tromjesečju trudnoće, talog može biti veći, no sadržavati manje vijabilnih stanica te će mu biti potrebno gušće nasadivanje (u manjoj količini medija nego što je uobičajeno).
3. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
4. Drugi dan natopiti kulture dodavanjem 2 ml proizvoda CHANG Amnio.
5. Nakon 4 do 5 dana provjeriti rast kultura. Hraniti kulture nakon što se zabilježi rast. Za hranjenje kultura ukloniti sav supernatant kulture i zamijeniti ga s 2 ml svježeg proizvoda CHANG Amnio. Preporučuje se da se nakon toga kulture hrane svaka 2 dana. Medij će se možda morati češće mijenjati za kulture krvavih uzoraka.
6. Peti dan ili nakon petog dana provjeriti rast kultura 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 tkivici

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 pacijentične vlastite amnijske tekućine. Dodati 4 ml proizvoda CHANG Amnio kako bi se postigao ukupan volumen od 5 ml po tkivici. Ako je uzorak prikupljen od pacijentice u trećem tromjesečju trudnoće, talog može biti veći, no sadržavati manje vijabilnih stanica te će mu biti potrebno gušće nasadivanje (u manjoj količini medija nego što je uobičajeno).
3. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
4. Peti dan provjeriti rast kultura. Zamijeniti medij s 2 ml svježeg proizvoda CHANG Amnio i prikupiti kulture ako je zabilježen dovoljan rast stanica.
5. Nakon toga svaki dan provjeravati rast kultura i u potpunosti mijenjati medij dok ne bude zabilježena dovoljna količina kolonija spremnih za prikupljanje. Medij će se možda morati češće mijenjati za kulture krvavih uzoraka.
6. Najbolji rezultati postižu se kada se kulture hrane proizvodom CHANG Amnio dan prije prikupljanja.

Upotreba proizvoda CHANG Amnio za uzgoj supkultiviranih stanica amnijske tekućine:

za supkultiviranje stanica tretirati kulture tripsinom (ili pronazom itd.) kao što se inače radi za uzgoj stanica u uobičajenom mediju. Međutim, potrebno je pažljivo nadzirati tretiranje proteazom. Stanice amnijske tekućine uzgojene u proizvodu CHANG Amnio često su osjetljivije na tretiranje proteazom nego što su to stanice amnijske tekućine uzgojene u uobičajenom mediju. Možda ćete

trebati prilagoditi svoj protokol kako biste navedeno uzeli u obzir.

Napomena: pH vrijednost medija koji se koristi za hranjenje kultura mora biti između 6,65 i 7,44 (tj. medij mora biti žućkasto-ružičaste boje). pH se može jednostavno prilagoditi postavljanjem medija u inkubator s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub> u posudi s lagano odvrnutim poklopcem na otprilike 30 minuta.

Upotreba proizvoda CHANG Amnio za seciranje CVS-a:

1. Pripremiti jednu Petrijevu zdjelicu veličine 100 mm x 15 mm podijelenu u 2 odjeljka i jednu Petrijevu zdjelicu veličine 60 mm x 15 mm. Unijeti 2 ml medija (bez seruma) u manju Petrijevu zdjelicu. Unijeti 4 ml medija u jedan odjeljak veće Petrijeve zdjelice i 6 ml medija u drugi odjeljak te iste zdjelice.
2. Pažljivo aspirirati medij i resice iz izvorne epruvete za centrifugu koja sadrži pacijentičin uzorak. Unijeti medij i resice u odjeljak veće Petrijeve zdjelice koji sadrži 4 ml medija za aspirat.
3. Koristeći se inverznim mikroskopom i dvjema sterilnim pincetama ukloniti krvne ugruške i endometriji koji se nalaze s vanjske strane korionskih resica. Pazite da ne oštetite krhke resice. Prenijeti očišćene resice u odjeljak veće Petrijeve zdjelice koji sadrži 6 ml medija.
4. Provesti završno čišćenje: pincetom uhvatiti resice i nježno ih pomicati dok su uronjene u medij kako bi se uklonio sav višak endometrija te uklonili krvni ugrušci i otpadne čestice. Ako je moguće, odabrati resice s vidljivim ograncima i venama. Utvrditi količinu resica prisutnu u uzorku radi pripreme optimalnog broja kultura (idealna količina po kulturi jest 5 mg; ne pripremati više od 20 mg resica).
5. Očišćene resice pincetom staviti u manju Petrijevu zdjelicu koja sadrži 2 ml medija (bez seruma) i zatim prenijeti resice i medij u epruvetu od 15 ml za centrifugu.

Upotreba proizvoda CHANG Amnio za primarne kulture CVS-a

1. Dodati 4 kapljice antibiotika (tj. 50 µg/ml gentamicinsulfata) u epruvetu za centrifugu i pustiti da odstoji 30 minuta.
2. Centrifugirati resice 5 minuta na otprilike 1.400 o/min.
3. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete tako da u njoj ostane 0,5 ml medija iznad taloga stanica (ili količina medija oko 2x veća od volumena taloga).
4. Nježno obnoviti suspenziju taloga. Dodati 2 ml medija CHANG Amnio u epruvetu za centrifugu.
5. Ponoviti korake 2. – 3. Dodati 2 ml tripsina i neometano inkubirati kulturu 10 minuta na 37 °C u atmosferi s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>. Izvaditi epruvetu iz inkubatora, obnoviti suspenziju taloga i vratiti u inkubator na dodatnih 10 minuta.
6. Izvaditi epruvetu za centrifugu iz inkubatora, obnoviti suspenziju taloga i centrifugirati 8 – 10 minuta na 1.400 o/min.
7. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete. Obnoviti suspenziju taloga, zatim dodati 1 ml kolagenaze u epruvetu i staviti u inkubator na 5 minuta.
8. Izvaditi iz inkubatora i vizualno provjeriti je li talog zamućen i potvrditi da nisu vidljivi jasni pojedinačni komadići resica. Ako talog nije zamućen, vratiti u inkubator na 5 minuta.
9. Ponavljati 8. korak dok talog ne bude zamućen. Dodati 3 ml proizvoda CHANG Amnio u epruvetu za centrifugu kako bi se zaustavilo djelovanje kolagenaze.
10. Centrifugirati epruvetu 8 – 10 minuta na 1.400 o/min.
11. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete tako da u njoj ostane 0,5 ml medija iznad taloga stanica (ili količina medija oko 2x veća od volumena taloga). Obnoviti suspenziju taloga prije dodavanja proizvoda CHANG Amnio koji se upotrebljava za pripremu.
12. Pripremiti optimalan broj kultura (otprilike po 1 kulturu za svakih 5 mg upotrijebljenih resica) primjenjujući 0,5 ml proizvoda CHANG Amnio po kulturi za svaku Petrijevu zdjelicu koja sadrži pokrovno stakalce.
13. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 % – 8 % CO<sub>2</sub>.
14. Drugi dan natopiti kulture dodavanjem 1,5 ml proizvoda CHANG Amnio.
15. Nakon 4 dana provjeriti rast kultura. Ako je zabilježen rast kultura, ukloniti medij i dodati 2 ml svježeg

proizvoda CHANG Amnio na svako pokrovno stakalce. Nakon toga hraniti kulture svaka 2 dana. Medij će se možda morati češće mijenjati za kulture krvavih uzoraka.

16. Peti dan provjeriti rast kultura i prikupiti ih kada bude zabilježena dovoljna količina kolonija.
17. Najbolji rezultati postižu se kada se kulture hrane proizvodom CHANG Amnio dan prije prikupljanja.

### POHRANA I STABILNOST

Proizvod čuvati zamrznut na temperaturi manjoj od -10 °C. Proizvod je stabilan do isteka roka valjanosti koji je naveden na oznaci boce kada ga se čuva u zamrznutom stanju. Neiskorišten proizvod može se raspodijeliti u alikvot odgovarajuće veličine za rad i ponovno zamrznuti za kasniju upotrebu ili ga se može čvrsto začepiti i čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše 30 dana. Smije ga se zamrzavati najviše dva puta. Zaštiti od fluorescentnog svjetla.

### MJERE OPREZA I UPOZORENJA

Prevideno je da se ovim proizvodom koristi osoba koje osposobljeno za postupke koji uključuju primjenu za koju je namijenjen ovaj proizvod.

Ne upotrebljavati bocu na kojoj je sterilno pakiranje oštećeno.

Ne upotrebljavati proizvod CHANG Amnio nakon isteka roka valjanosti navedenog na oznaci.

## MALTI

### INDIKAZZJONI GHALL-UŻU

CHANG Amnio b' Gentamicin u L-Glutamine jista' jiġi użat għall-applikazzjonijiet li ġejjin:

- il-koltura primarja ta' ċelloli tal-fluwidu amnijotiku
- it-tkabbir ta' ċelloli sottokultivati tal-fluwidu amnijotiku
- tessut amnijotiku solidu minn kampjuni ta' villi korjonici.

Dan il-medium ġie ddisinjat għall-użu f'inkubaturi tal-CO<sub>2</sub> (kolturi ekwilibriati b'atmosfera ta' 5%-8% CO<sub>2</sub>).

Il-pH finali jrid ikun bejn 6.65-7.44. Jekk jogħġbok ara l-Istruzzjonijiet dwar l-Użu.

### DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

CHANG Amnio huwa midjum komplet, lest għall-użu għall-koltura primarja ta' ċelloli tal-fluwidu amnijotiku uman (AFC), it-tehid ta' kampjuni tal-villus korjoniku (CVS), u prodotti tal-konċepiment (POC) għall-użu fil-karjotipar u testijiet ġenetiċi prenatali oħra. Dan ġie ottimizzat kemm għall-metodoloġiji fil-flask kif ukoll in situ. Dan il-prodott fih l-antibijotiku Gentamicin Sulfate (50 µg/mL)

### KOMPONENTI

Bafers	Proteini, Ormoni u Fatturi ta' Tkabbir	Magnesium sulfate
Sodium bicarbonate	Fetal bovine serum (FBS)	Sodium phosphate
<b>Antiossidant</b>	Acidi nuklejiċi	
Thiocitic acid	Deoxyadenosine	
	Deoxycytidine	
	Deoxyguanosine	
<b>Antibijotiku</b>	Adenosine	
Gentamicin Sulfate	Cytidine	
	Guanosine	
	Thymidine	
	Uridine	
	<b>Ohrajn</b>	
	Ethyl alcohol	
	Thyronine	
	<b>Vitamini</b>	
	u mikroelementi	
	tal-Enerġija	
	Ascorbic acid	
	Folic acid	
	Nicotinamide	
	Riboflavin	
	Thiamine	
	Pantothenic acid	
	Cobalamin	
	Sodium chloride	
	Sodium selenite	
	Pyridoxine	
	Calcium chloride	
	Biotin	
	Choline chloride	
	<b>Ilma</b>	
	Potassium chloride	
	Potassium phosphate	
	Kwalità tal-WFI (Ilma għall-injezzjonijiet)	

### ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

#### STERILITÀ

Serum użat fil-produzzjoni ta' CHANG Amnio ġie ttestjat għall-kontaminazzjoni minn viruses skont CFR Titolu 9 Taqsima 113.53. Gie skrinjat ukoll għall-kontaminazzjoni minn mikoplażma. CHANG Amnio jiġi sterilizzat permezz ta' filtrazzjoni minn go filtru ta' 0.1 mikron. Kampjuni ta' CHANG Amnio jiġu ttestjati għall-possibbiltà ta' kontaminazzjoni batterjoloġika skont il-protokoll ta' ttestjar għall-isterilità deskritt fit-test attwali tal-USP għall-isterilità <71>.

### PREPARAZZJONI GHALL-UŻU

Holl malajr billi ddawwar il-flixkun f'banjumarija f'temperatura ta' 37°C.

CHANG Amnio fih gentamicin (50 mg/L). Jistgħu jidiedu antibijotiċi addizzjonali jekk ikun mixtieġ.

#### IL-PREPARAZZJONI TA' CHANG Amnio F'ALIKWOTI

- Holl CHANG Amnio skont l-istruzzjonijiet ta' hawn fuq.
- Qassam b'mod asettiku f'alikwoti ta' daqs konvenjenti u erġa' ffriza.
- Holl l-alikwoti f'banjumarija f'temperatura ta' 37°C meta jkunu se jintużaw.

### ISTRUZZJONIJET DWAR L-UŻU

L-Użu ta' CHANG Amnio għal Kulturi Primarji: Metodoloġiji *in situ*

- lċentrifuga l-fluwidu amnijotiku fuq madwar 1,200 rpm

- għal 10 minuti sabieix iċ-ċelloli jiġu kkonċentrati.
- Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u halli madwar 0.5 mL fuq il-gerbuba taċ-ċelloli (jew madwar 2x il-volum tal-gerbuba) tal-fluwidu amnijotiku ċċentrifugat. Ipprepara alikwoti tas-supernatant (mill-inqas 1 mL, jekk hu possibbli) għal assaġġi għal alpha-fetoprotein (AFP) u acetyl cholinesterase, jekk mehtieġ. Jekk il-kampjun ikun fih id-dem, ipprepara alikwota addizzjonali għal testijiet ulterjuri. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli f'volum żgħir tal-fluwidu amnijotiku tal-pazjent stess. Żid ammont suffiċjenti ta' CHANG Amnio lis-sospensjoni taċ-ċelloli kkonċentrati sabieix ikun hemm volum ta' plakkament finali ta' 0.5 mL għal kull coverslips (total ta' 4 coverslips, skont id-daqs tal-gerbuba taċ-ċelloli) jew 2 mL għal kull flasketta. Jekk il-kampjun ikun ġie minn pazjenta fit-tielet trimestru tat-tqala, jista' jkun li l-gerbuba tkun ikbar iżda jkun fih inqas ċelloli vijabbli, għalhekk tkun tehtieġ inseminazzjoni iktar qawwija (inqas midja min-normal).
- Inkuba l-kolturi minghajr ċaqliq f'temperatura ta' 37°C f'atmosfera ta' 5%-8% CO<sub>2</sub>.
- Għarraġ il-kolturi fit-2 jum billi żżid 2 mL ta' CHANG Amnio.
- Wara 4 jew 5 ijiem, għandu jiġi ċċekkjat kemm kibru l-kolturi. Il-kolturi għandhom jiġu misqija malli jiġi osservat li bdew jikbru. Isqi l-kulturi billi tneħhi s-supernatant kollu tal-kultura u tiddlu b'2 mL ta' CHANG Amnio frisk. Huwa rrakkomandat li mbagħad il-kolturi jiġu misqijin kull jumejn. Għall-kampjuni bid-dem, il-kolturi jistgħu jkunu jehtieġu tibdil iktar ta' spiss tal-midja.
- lċċekkja kemm kibru l-kolturi fil-5 jum jew wara, u aħsad meta jiġi osservat numru suffiċjenti ta' kolonji.
- Jinkisbu l-aħjar riżultati meta l-kulturi jiġu misqijin b'CHANG Amnio fil-jum ta' qabel il-ħsad.

L-Użu ta' CHANG Amnio għal Kulturi Primarji: Metodoloġiji fil-Flask

- lċċentrifuga l-fluwidu amnijotiku fuq madwar 1,200 rpm għal 10 minuti sabieix iċ-ċelloli jiġu kkonċentrati.
- Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u halli madwar 0.5 mL fuq il-gerbuba taċ-ċelloli (jew madwar 2x il-volum tal-gerbuba) tal-fluwidu amnijotiku ċċentrifugat. Ipprepara alikwoti tas-supernatant (mill-inqas 1 mL, jekk hu possibbli) għal assaġġi għal alpha-fetoprotein (AFP) u acetyl cholinesterase, jekk mehtieġ. Jekk il-kampjun ikun fih id-dem, ipprepara alikwota addizzjonali għal testijiet ulterjuri. Erġa' ssospendi l-gerbuba taċ-ċelloli f'volum żgħir tal-fluwidu amnijotiku tal-pazjent stess. Żid 4 mL ta' CHANG Amnio għal volum totali ta' 5 mL għal kull flask. Jekk il-kampjun ikun ġie minn pazjenta fit-tielet trimestru tat-tqala, jista' jkun li l-gerbuba tkun ikbar iżda jkun fih inqas ċelloli vijabbli, għalhekk tkun tehtieġ inseminazzjoni iktar qawwija (inqas media min-normal).
- Inkuba l-kolturi minghajr ċaqliq f'temperatura ta' 37°C f'atmosfera ta' 5%-8% CO<sub>2</sub>.
- Fil-5 jum iċċekkja kemm kibru. Biddel il-midjum b'2 mL CHANG Amnio frisk u aħsad jekk jiġi osservat tkabbir suffiċjenti taċ-ċelloli.
- lċċekkja kemm kibru l-kolturi u mbagħad biddel il-medium kompletament kuljum sakemm jiġi osservat numru suffiċjenti ta' kolonji u jkunu lesti għall-ħsad. Għall-kampjuni bid-dem, il-kolturi jistgħu jkunu jehtieġu tibdil iktar ta' spiss tal-midja.
- Jinkisbu l-aħjar riżultati meta l-kulturi jiġu misqijin b'CHANG Amnio fil-jum ta' qabel il-ħsad.

L-użu ta' CHANG Amnio għat-Tkabbir ta' Ċelloli Sottokultivati tal-Fluwidu Amnijotiku:

Għas-sottokultivazzjoni taċ-ċelloli, ittratta l-kulturi bit-tripsina (jew pronase, eċċ) bħalma jsir normalment meta ċ-ċelloli jitkabbru f'midjum konvenzjonali. Madankollu, it-trattament bil-protease għandu jiġi monitorjat bir-reqqa. Ċelloli tal-fluwidu amnijotiku mkabбра fi CHANG Amnio għandhom tendenza li jkunu iktar sensitivi għat-trattament bil-protease mill meta jkunu mkabбра f'midjum konvenzjonali. Jista' jkun mehtieġ li l-protokoll tiegħek jiġi modifikat sabieix jittiehed akkont ta' dan.

Nota: Il-pH tal-midjum użat biex jitma l-kolturi jrid ikun bejn

6.65-7.44 (jiġifieri l-midjum irid ikun ta' kulur fit safrani-fis-salamun). Il-pH jista' jiġi aġġustat b'mod haħff billi tpoġġi l-midjum go inkubatur ta' 5%-8% CO<sub>2</sub> bit-tapp maħlul fit għal madwar 30 minuta.

L-użu ta' CHANG Amnio għad-dissezzjoni tal-CVS:

- Ipprepara petri dixx wiehed ta' daqs 100 mm x 15 mm maqsum f'żewġ partijiet u petri dixx wiehed ta' daqs 60 mm x 15 mm. Iddispensa 2 mL tal-midja (minghajr serum) fil-petri dixx iż-żgħir. Iddispensa 4 mL tal-midja f'parti waħda tal-petri dixx il-kbir u 6 mL tal-midja fil-parti l-oħra tal-istess dixx.
- Bir-reqqa aspira l-midja u l-villi mit-tubu ċċentrifugali oriġinali li fih hemm il-kampjun tal-pazjent. Iddispensa l-midja u l-villi fil-parti tal-petri dixx il-kbir flimkien ma' 4 mL tal-midja tal-aspirazzjoni.
- Permezz ta' mikroskopju invertit u żewġ forbiċi sterili, neħhi l-emboli tad-dem u xi deċiduwa matern li jista' jkun hemm min-naħa ta' barra tal-villi korjonici. Oqgħod attent li ma ssir ħsara lill-villi fraġli. Ittraferixxi l-villi mnaddfa fil-parti ta' 6 mL tal-petri dixx il-kbir.
- Aghmel tindifa tal-aħjar, billi tuża l-forbiċi biex taqbad il-villi u ċċaqlaqhom bil-mod filwaqt li huma mgħarraġa fil-midja sabieix jitneħha kull deċiduwa żejjed, emboli tad-dem u jew debris li jista' jkun hemm. Aghžel vili b'fergħat u vini viżibbli, jekk hu possibbli. Iddetermina l-ammont ta' villi preżenti u pprepara n-numru ottimu ta' kulturi (5 mg huwa l-ammont ideali li għandu jintuża għal kull kultura; tippreparax iktar minn 20 mg ta' villi).
- Poggi l-villi mnaddfa fil-petri dixx iż-żgħir flimkien ma' 2 mL tal-midja (minghajr serum) bl-użu tal-forbiċi u mbagħad ittraferixxi l-villi u l-midja go tubu ċċentrifugali ta' 15 mL.

L-Użu ta' CHANG Amnio għall-Kulturi Primarji ta' CVS

- Żid 4 taqtiriet ta' antibijotiku (jiġifieri Gentamicin Sulfate, 50 µg/mL) lit-tubu ċċentrifugali u halli joqgħod għal 30 minuta.
- lċċentrifuga l-villi fuq madwar 1,400 rpm għal 5 minuti.
- Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u halli madwar 0.5 mL fuq il-gerbuba taċ-ċelloli (jew madwar 2x il-volum tal-gerbuba).
- Erġa' ssospendi l-gerbuba bil-mod. Żid 2 mL ta' CHANG Amnio media lit-tubu taċ-ċċentrifugu.
- Irrepeti l-punti 2-3. Żid 2 mL trypsin u inkuba l-kultura minghajr ċaqliq f'temperatura ta' 37°C, f'atmosfera ta' 5%-8% CO<sub>2</sub> għal 10 minuti. Neħhi t-tubu mill-inkubatur, erġa' ssospendi l-gerbuba u poġġi fi-inkubatur għal 10 minuti oħra.
- Neħhi t-tubu tal-magna ċċentrifuga mill-inkubatur, erġa' ssospendi l-gerbuba u ċċentrifuga għal 8-10 minuti fuq 1,400 rpm.
- Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat. Erġa' ssospendi l-gerbuba, imbagħad żid 1 mL ta' collagenase u poġġi fi-inkubatur għal 5 minuti.
- Neħhi mill-inkubatur u viżwalment iċċekkja biex tara jekk il-gerbuba tidher imdardra u li ma jidhrux biċċiet individwali distinti ta' villi. Jekk il-gerbuba ma tidher imdardra, erġa' poġġi fi-inkubatur għal 5 minuti.
- Irrepeti l-punt 8 sakemm il-gerbuba tidher imdardra. Żid 3 mL CHANG Amnio fit-tubu ċċentrifugali sabieix titwaqqaf l-ażżjoni tal-collagenase.
- lċċentrifuga t-tubu għal 8-10 minuti fuq 1,400 rpm.
- Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u halli madwar 0.5 mL fuq il-gerbuba taċ-ċelloli (jew madwar 2x il-volum tal-gerbuba). Erġa' ssospendi l-gerbuba qabel ma żżid iċ-CHANG Amnio li nutuza għall-preparazzjoni.
- Ipprepara n-numru ottimu ta' kulturi (madwar kultura waħda (1) għal kull 5 mg ta' villi użati) bl-użu ta' 0.5 mL ta' CHANG Amnio għal kull kultura għal kull petri dixx li fih kopertina.
- Inkuba l-kulturi minghajr ċaqliq f'temperatura ta' 37°C f'atmosfera ta' 5%-8% CO<sub>2</sub>.
- Għarraġ il-kulturi fit-tieni (2) jum billi żżid 1.5 mL CHANG Amnio.
- Wara 4 ijiem, għandu jiġi ċċekkjat kemm kibru l-kulturi. Jekk jiġi nnutat li kibru, neħhi l-midja u żid 2 mL CHANG Amnio frisk lill kull coverslip. Il-kulturi mbagħad għandhom jiġu misqijin kull jumejn. Għall-kampjuni bid-dem, il-kolturi jistgħu jkunu jehtieġu tibdil iktar ta' spiss tal-midja.

16. lċċekkja kemm kibru l-kulturi fil-5 jum u aħsad meta jiġi osservat numru suffiċjenti ta' kolonji.

17. Jinkisbu l-aħjar riżultati meta l-kulturi jiġu misqijin b'CHANG Amnio fil-jum ta' qabel il-ħsad.

### HAŻNA U STABILITÀ

Aħžen iffrizat f'temperatura ta' -10°C. Il-prodott huwa stabbli sad-data ta' skadenza li tidher fuq it-tikketta tal-flixkun meta maħzun iffrizat. Jekk jibqqa' xi ammont ta' prodott li ma nutużax jista' jiġi ddispensat f'alikwoti uttilizzabbli u ffrizat mill-gdid għal użu fil-futur, jew jingħalaq sew u jinħażen f'temperatura ta' 2°C sa 8°C għal mhux iktar minn 30 jum; jista' jiġi ffrizat sa massimu ta' darbejtn. Ipproteġi minn dawl fluworexcenti.

### PREKAWZJONIJET U TWISSIJET

Dan l-apparat huwa maħsub għall-użu minn persunal imħareġ fi proċeduri li jinkludu l-applikazzjoni indikata li għaliha huwa maħsub l-apparat.

M'għandek tuża l-ebda flixkun li l-imballaġġ sterili tiegħu jkun ġie kompromess.

M'għandekx tuża CHANG Amnio wara d-data ta' skadenza indikata fuq it-tikketta.

## SLOVENŠČINA

### INDIKACIJE ZA UPORABO

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

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

Ta medij je zasnovan za uporabo v CO<sub>2</sub>-inkubatorjih (kulture, uravnotežene v atmosferi s 5–8 % CO<sub>2</sub>).

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 konceptijskih 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 gentamicinijev sulfat (50 µg/ml).

### KOMPONENTE

<b>Pufri</b> Natrijev bikarbonat	<b>Beljakovine</b> <b>hormoni in rastni faktorji</b> Serum govejega zarodka (FBS) Serum novorojenega teleta Humani transferin Fibroblastni rastni faktor (FGF)	<b>Nukleinske kisline</b> Deoksiadenozin Deoksicitidin Deoksigvanozin Adenozin Citidin Gvanozin Timidin Uridin
<b>Antioksidant</b> Tiotična kislina	Serum govejega zarodka (FBS) Serum novorojenega teleta Humani transferin Fibroblastni rastni faktor (FGF)	<b>Drugo</b> Etilni alkohol Tironin
<b>Antibiotik</b> Gentamicinijev sulfat	Human transferin Fibroblastni rastni faktor (FGF)	
<b>Aminokislina</b> Alanin Arginin Asparagin Asparaginska kislina Cistein Glutaminska kislina Glutamin Glicin Histidin Izolevcin Levcin Lizin Metionin Fenilalanin Prolin Serin Treonin Triptofan Tirozin Valin	<b>Indikator vrednosti</b> pH Fenol rdeče	<b>Vitamini in elementi v sledovih</b> Askorbinska kislina Folna kislina Nikotinamid Riboflavin Tiamin Pantotenska kislina Kobalamin Pridoksin Biotin
	<b>Energijski substrati</b> Glukoza Piruvat Inozitol	
	<b>Soli in ioni</b> Natrijev klorid Natrijev selenit Kalcijev klorid Holnklorid Kalijev klorid Kalijev fosfat Magnezijev sulfat Natrijev fosfat	<b>Voda</b> 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

Medij hitro odtalite tako, da sukate steklenico v vodni kopeli s temperaturo 37 °C.

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

#### ALIKVOTIRANJE MEDIJA CHANG AMNIO

1. Medij CHANG Amnio odtalite po zgornjih navodilih.
2. Z aseptično tehniko ga porazdelite na alikvote primerne velikosti in ponovno zamrznete.
3. 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*

1. Amnijsko tekočino 10 minut centrifugirajte pri približno 1200 vrt./min, da koncentrirate celice.

2. 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 alfafetoproteina (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 krovnih stekelc 0,5 ml na stekelce (skupaj 4 krovnja 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).
3. Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO<sub>2</sub> pri 37 °C.
4. 2. dan kulture zalijte z 2 ml medija CHANG Amnio.
5. Po 4 do 5 dneh preverite, ali kulture rastejo. Ko opazite rast, morate kulture nahraniti. Kulture nahranite tako, ga odstranite ves 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.
6. Na 5. dan ali po 5. dnevu preverite, koliko so kulture zrasle, in jih spravite, ko opazite dovolj kolonij.
7. 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

1. Amnijsko tekočino 10 minut centrifugirajte pri približno 1200 vrt./min, da koncentrirate celice.
2. 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 alfafetoproteina (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).
3. Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO<sub>2</sub> pri 37 °C.
4. Na 5. dan preverite rast. Medij zamenjajte z 2 ml svežega medija CHANG Amnio in spravite celice, če opazite zadostno rast.
5. V nadaljevanju vsak dan preverite rast kultur in zamenjajte medij v celoti, dokler ne opazite, da je dovolj kolonij pripravljenih. 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.
6. 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. medij mora biti rahlo rumenkaste barve lososa). Vrednost pH zlahka prilagodite tako, da medij za 30 minut postavite v inkubator s 5–8 % CO<sub>2</sub> (pokrovček naj bo nekoliko priprt).

Uporaba medija CHANG Amnio za disekcijo CVS:

1. Pripravite petrijevko velikosti 100 mm x 15 mm, razdeljeno na 2 predelka, in petrijevko velikosti

60 mm x 15 mm. V manjšo petrijevko prenesite 2 ml medija (brez seruma). V en predelek velike petrijevke dajte 4 ml medija, v drugi predelek iste petrijevke pa 6 ml medija.

2. Previdno aspirirajte medij in resice iz prvotne centrifugirane epruvete, ki vsebuje vzorec. Medije in resice dodajte v predelek večje petrijevke, ki vsebuje 4 ml aspiracijskega medija.
3. S pomočjo inverznega mikroskopa in para sterilnih prijemalk odstranite krvne strdke in morebitno maternalno decidualno membrano z zunanje strani horionskih resic. Pazite, da občutljivih resic ne poškodujete. Očiščene resice prenesite v 6-ml predelek večje petrijevke.
4. Opravite končno čiščenje tako, da s prijemalkami zgrabite resice in jih nežno premešate, medtem ko so potopljene v medij, da odstranite odvečno decidualno membrano, krvne strdke ali razne ostanke. Če je mogoče, izberite resice z vidnimi vejami in žilami. Preverite količino prisotnih resic, da boste lahko pripravili optimalno število kultur (najprimernejša količina je 5 mg na kulturo; ne pripravite več kot 20 mg resic).
5. S prijemalkami prenesite očiščene resice v manjšo petrijevko z 2 ml medija (brez seruma), nato pa prenesite resice in medije v 15 ml centrifugirano epruveto.

Uporaba medija CHANG Amnio za primarne kulture CVS

1. Dodajte 4 kapljice antibiotika (tj. gentamicinijev sulfat, 50 µg/ml) v centrifugirano epruveto in počakajte 30 minut.
2. 5 minut centrifugirajte resice pri 1400 vrt./min.
3. Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar pustite 0,5 ml medija nad celično usedlino (ali približno dvakratni volumen usedline).
4. Usedlino nežno ponovno suspendirajte. Dodajte 2 ml medija CHANG Amnio v centrifugirano epruveto.
5. Ponovite koraka 2 in 3. Dodajte 2 ml tripsina in pustite kulturo, da se 10 minut nemoteno inkubira pri temperaturi 37 °C v atmosferi s 5–8 % CO<sub>2</sub>. Vzemite epruveto iz inkubatorja, ponovno suspendirajte usedlino in jo postavite v inkubator za dodatnih 10 minut.
6. Vzemite centrifugirano epruveto iz inkubatorja, ponovno suspendirajte usedlino in centrifugirajte 8–10 minut pri 1400 vrt./min.
7. Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete. Ponovno suspendirajte usedlino, nato v epruveto dodajte 1 ml kolagenaze in jo postavite v inkubator za 5 minut.
8. 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 5 minut.
9. Ponavljajte 8. korak, dokler usedlina ni motna. Dodajte 3 ml medija CHANG Amnio v centrifugirano epruveto, da ustavite delovanje kolagenaze.
10. Epruveto centrifugirajte 8–10 minut pri 1400 vrt./min.
11. Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar pustite 0,5 ml medija nad celično usedlino (ali približno dvakratni volumen usedline). Ponovno suspendirajte usedlino, preden dodate medij CHANG Amnio, ki ste ga uporabili za pripravo.
12. Pripravite optimalno število kultur (približno 1 kultura na vsakih 5 mg uporabljenih resic) z 0,5 ml medija CHANG Amnio na kulturo za vsako petrijevko, ki vsebuje krovno stekelce.
13. Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO<sub>2</sub> pri 37 °C.
14. 2. dan kulture zalijte z 1,5 ml medija CHANG Amnio.
15. Po 4 dneh preverite, ali kulture rastejo. Če opazite rast, odstranite medij in na vsako krovno stekelce dodajte 2 ml svežega medija CHANG Amnio. Potem morate kulture nahraniti vsaka 2 dni. Če vzorci vsebujejo kri, bo morda treba pogosteje zamenjati medij za gojenje kultur.
16. Na 5. dan preverite, koliko so kulture zrasle, in jih spravite, ko opazite dovolj kolonij.
17. 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. Neuporabljen 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. Zaščitite 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.