FUJIFILM IrvineScientific

CHANG Amnio

with Gentamicin and L-Glutamine

Catalog No. 99473 **100 mL, 500 mL**

For *in vitro* diagnostic use.

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Pour diagnostics *in vitro*.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Til *in vitro*-diagnostik.

In vitro -diagnostiikkaan.

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.

İn vitro diagnostik kullanım için.

Na diagnostické použitie *in vitro*.

За *in vitro* диагностична употреба.

Za upotrebu u *in vitro* dijagnostici.

Għal użu dijanjostiku *in vitro*.

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Glossary of Symbols*:

REF	Catalog Number
LOT	Lot Number
STERILE A	Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)
	Expiration: Year - Month - Day
	Caution, consult accompanying documents
	Consult instructions for use
-10°C	Storage Temperature store below -10°C
2 STERILIZE	Do Not Re-Sterilize
	Do not use if package is damaged
	Manufacturer
CE	CE Mark
EC REP	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.

FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.
2511 Daimler Street, Santa Ana, California 92705 USA
Telephone: 1 949 261 7800 • 1 800 437 5706 • Fax: 1 949 261 6522 • www.irvinesci.com

© 2020 FUJIFILM Irvine Scientifc, Inc. All rights reserved. the Irvine Scientifc logo and CHANG Amnio are trademarks of FUJIFILM Irvine Scientifc, Inc. in various jurisdictions.

PN 40965 Rev.4

ENGLISH

INDICATION FOR USE

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

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

This medium has been designed for use in CO_2 incubators (cultures equilibrated with 5%-8% CO_2 atmosphere).

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

DEVICE DESCRIPTION

CHANG Amnio is a complete, ready-to-use medium for the primary culture of human amniotic fluid cells (AFC), chorionic villus sampling (CVS), and products of conception (POC) for use in 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

Buffers	Proteins, Hormones, and Growth Factors	Magnesium sulfate
Sodium bicarbonate	Fetal bovine serum (FBS)	Sodium phosphate
Antioxidant	Newborn bovine serum	Nucleic acids
Thioctic acid	Human transferrin	Deoxyadenosine
Antibiotic	Fibroblast growth factor (FGF)	Deoxycytidine
Gentamicin Sulfate	Insulin	Deoxyguanosine
Amino Acid	Progesterone	Adenosine
Alanine	Testosterone	Cytidine
Arginine	Beta estradiol	Guanosine
Asparagine	Hydrocortisone	Thymidine
Aspartic Acid		Uridine
Cysteine		Other
Glutamic Acid		Ethyl alcohol
Glutamine	pH Indicator	Thyronine
Glycine	Phenol red	
Histidine		Vitamins and trace elements
Isoleucine	Energy Substrates	Ascorbic acid
Leucine	Glucose	Folic acid
Lysine	Pyruvate	Nicotinamide
Methionine	Inositol	Riboflavin
Phenylalanine		Thiamine
Proline	Salts & Ions	Pantothenic acid
Serine	Sodium chloride	Cobalamin
Threonine	Sodium selenite	Pyridoxine
Tryptophan	Calcium chloride	Biotin
Tyrosine	Choline chloride	
Valine	Potassium chloride	Water
	Potassium phosphate	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 on a sterile countertop at room temperature or by placing bottle in a 37°C water bath.

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

ALIQUOTING CHANG Amnio

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

DIRECTIONS FOR USE

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

1. Centrifuge amniotic fluid at approx. 1,200 rpm for 10 minutes to concentrate the cells.
2. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving approx. 0.5 mL above cell pellet (or about 2x volume of pellet) of spun amniotic fluid. Aliquot supernatant (at least 1 mL, if possible) for alpha-fetoprotein (AFP) and acetyl cholinesterase assays, if necessary. If specimen is bloody, prepare an additional aliquot for further testing. Resuspend cell pellet in small volume of patient's own amniotic fluid. Add 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).
3. Incubate cultures undisturbed at 37°C 5-8% CO_2 atmosphere.
4. Flood cultures on day 2 by adding 2 mL of CHANG Amnio.
5. After 4 to 5 days, cultures should be checked for growth. Cultures should be fed once growth has been observed. Feed cultures by removing all of the culture supernatant and replacing with 2 mL fresh CHANG Amnio. It is recommended that cultures be fed every 2 days thereafter. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
6. Check cultures for growth on, or after, day 5, and harvest when sufficient colonies are observed.
7. Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

Use of CHANG Amnio for Primary Cultures: Flask Methodologies

1. Centrifuge amniotic fluid at approx. 1,200 rpm for 10 minutes to concentrate the cells.
2. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving approx. 0.5 mL above cell pellet (or about 2x volume of pellet) of spun amniotic fluid. Aliquot supernatant (at least 1 mL, if possible) for alpha-fetoprotein (AFP) and acetyl cholinesterase assays, if necessary. If specimen is bloody, prepare an additional aliquot for further testing. Resuspend cell pellet in small volume of patient's own amniotic fluid. Add 4 mL of CHANG Amnio for a total volume of 5 mL per flask. If specimen is received from a patient in the third trimester of pregnancy, the pellet may be larger but contain less viable cells, thus requiring heavier seeding (less media than normal).
3. Incubate cultures undisturbed at 37°C, 5%-8% CO_2 atmosphere.
4. Check for growth on day 5. Change medium with 2 mL of fresh CHANG Amnio and harvest if sufficient cell growth is observed.
5. Check cultures for growth and completely change medium every day thereafter until sufficient colonies are observed and are ready to harvest. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
6. Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

Use of CHANG Amnio for Growing Passaged Amniotic Fluid Cells:

To passage the cells, treat cultures with trypsin (or 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_2 incubator with the cap slightly loosened for about 30 minutes.

Note: Calcium Oxalate crystals commonly form in CHANG Amnio. The presence of these crystals has not been shown to cause any detrimental effect on product performance.

Chorionic Villi Sample Preparation:

1. Label a Petri dish for each specimen received, and transfer contents of sample aseptically. Add 5 mL of the prewarmed CHANG Amnio complete media to the dish, and place in an incubator for 30 minutes, at 35 - 39°C, 5 - 8% CO_2 atmosphere, to allow the blood to settle.
2. Clean specimen using a dissecting microscope, initially under 1.5X magnification, then adjusting to about 3X magnification. Note: Approx. 20 - 40 mg of chorionic villi sample is required.
3. Using two pairs of sterile forceps, remove blood clots and any maternal decidua from the villus material, while working within the dish, under the dissecting microscope. Villus material is light colored, tubular and/ or lumpy with visible branches and veins.
4. Transfer clean villi to another Petri dish containing prewarmed CHANG Amnio complete media. Perform final cleaning, using forceps to grasp villi and agitate gently. Note: 5 mg is the ideal amount to use per culture. Be careful to avoid damaging the fragile villi.
5. Transfer villi and media to a 15 mL centrifuge tube, and add 4 drops of antibiotic (ie. Gentamicin Sulfate, 50 µL/mL) to the centrifuge tube. Let sit for 30 minutes.
6. Centrifuge villi at approx. 1,400 rpm for 5 minutes.

Chorionic Villi Sample Culture:

1. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, making sure to leave 0.5 mL of media above cell pellet (or about 2X volume of pellet).
2. Gently resuspend pellet. Add 2 mL of prewarmed CHANG Amnio media to centrifuge tube.
3. Add 2 mL of Trypsin EDTA and incubate culture undisturbed at 35 - 39°C, 5 - 8% CO_2 atmosphere for 10 minutes. Remove tube from incubator, resuspend pellet and place in incubator for 10 additional minutes.
4. Remove centrifuge tube from incubator, resuspend pellet and centrifuge for 8 -10 minutes at 1,400 rpm.
5. Aspirate supernatant from the centrifuged tube. Resuspend pellet, then add 1 mL of collagenase to tube and place in incubator for 5 minutes.
6. Remove from incubator and visually check to see if pellet is cloudy and no distinct pieces of individual villi can be seen. If pellet is not cloudy, place back in incubator for 5 more minutes.
7. Add 3 mL of prewarmed CHANG Amnio to centrifuge tube to stop the action of the collagenase.
8. Centrifuge tube for 8- 10 minutes at 1,400 rpm.
9. Aspirate supernatant from the centrifuged tube, leaving 0.5 mL of media above cell pellet. Resuspend pellet before adding CHANG Amnio used for set up.
10. Set up optimal number of cultures using 0.5 mL of CHANG Amnio per culture for each petri dish that contains a coverslip.
11. Incubate cultures undisturbed at 35 - 39°C, 5 - 8% CO_2 atmosphere.
12. Flood cultures on day 2 by adding 1.5 mL of prewarmed CHANG Amnio.
13. At 4 days, cultures should be checked for growth. If growth is observed, remove media and add 2 mL of fresh prewarmed CHANG Amnio to each coverslip. Cultures should be fed every 2 days thereafter. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
14. Check cultures for growth on day 5, and harvest when sufficient colonies are observed. Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

STORAGE AND STABILITY

Store frozen below -10°C. Product is stable until the expiration date on the bottle label when stored frozen. Unused product can be dispensed into working aliquots and refrozen for later use, or tightly capped and stored at 2°C to 8°C for up to 30 days; it may be frozen a maximum of two times. Protect from fluorescent light.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

This device is intended to be used by staff trained in procedures that include the indicated application for which the device is intended.

Do not use any bottle in which the sterile packaging has been compromised.

Do not use CHANG Amnio beyond the expiration date indicated on the label.

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Pożywka CHANG Amnio z gentamycyną i L-glutaminą może być stosowana w przypadku:
1. hodowli pierwotnej komórek płynu owodniowego,
2. wzrostu pasażowanych komórek płynu owodniowego,
3. litej tkanki owodniowej z biopsji kosmków kosmówki.

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

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

OPIS WYROBU

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

SKŁADNIKI

Bufory	Białka, hormony	Siarczan magnezu
Wodorowęglan	i czynniki wzrostu	Fosforan sodu
sodu	Płodowa surowica	
	bydlęca (FBS)	Kwasy nukleinowe
Antyoksydant	Surowica	Deoksyadenozyna
Kwas tiooktanowy	nowonarodzonych	Deoksycytydyna
	cieląt	Deoksyguanozyna
Antybiotyk	Ludzka transferryna	Adenozyna
Siarczan	Czynniki wzrostu	Cytydyna
gentamycyny	fibroblastów (FGF)	Guanozyna
	Insulina	Tymidyna
Aminokwasy	Progesteron	Urydyna
Alanina	Testosteron	
Arginina	Beta-estradiol	Inne
Asparagina	Hydrokortyzon	Alkohol etylowy
Kwas asparaginowy		Tyronina
Cysteina	Wskaźnik pH	
Kwas glutaminowy	Czerwień fenolowa	Witaminy
Glutamina		i pierwiastki
Glicyna	Substraty	śladowe
Histydyna	energetyczne	Kwas askorbinowy
Izoleucyna	Glukoza	Kwas foliowy
Leucyna	Pirogronian	Nikotynamid
Lizyna	Inozytol	Ryboflawina
Metionina		Tiamina
Fenyloalanina	Sole i jony	Kwas pantotenowy
Prolina	Chlorek sodu	Kobalamina
Seryna	Selenian sodu	Pirydoksyna
Treonina	Chlorek wapnia	Biotyna
Tryptofan	Chlorek choliny	
Tyrozyna	Chlorek potasu	Woda
Walina	Fosforan potasu	Woda o jakości WFI

ZAPEWNIANIE JAKOŚCI

STERYLNOŚĆ

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

PRZYGOTOWANIE DO UŻYCIA

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

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

ROZDZIELANIE POŻYWKI CHANG Amnio NA PORCJE
1. Rozmrozić pożywkę CHANG Amnio zgodnie z powyższymi instrukcjami.
2. W sposób aseptyczny rozdzielić pożywkę 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 pożywki CHANG Amnio dla hodowli pierwotnych: metody *in situ*
1. Wirować płyn owodniowy przy prędkości około 1200 rpm przez 10 minut, aby zatężyć komórki.
2. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej probówki, 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 pożywki CHANG Amnio do zatężonej zawiesiny komórkowej, aby uzyskać końcową objętość posiewu równą 0,5 ml na szkiełko nakrywkowe (łącznie 4 szkiełka nakrywkowe, w zależności od rozmiaru osadu komórkowego) lub 2 ml na butelkę hodowlaną. Jeśli próbkę pobrano od pacjentki w trzecim trymestrze ciąży, osadu może być więcej, ale może on zawierać mniej żywe komórki, z tego względu konieczny będzie bardziej stężony posiew (mniej pożywki niż zwykle).
3. Inkubować hodowle w temperaturze 37°C w atmosferze 5–8% CO_2, nie zakłócając ich.
4. W dniu 2. zalać hodowle, dodając 2 ml pożywki CHANG Amnio.
5. Po 4–5 dniach sprawdzić wzrost hodowli. Po zaobserwowaniu wzrostu należy zasilić hodowle pożywką. Zasilać hodowle pożywką, usuwając cały nadsącz hodowli i zastępując go 2 ml świeżej pożywki CHANG Amnio. Po wykonaniu tej czynności zalecane jest zasilanie hodowli pożywką co 2 dni. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożywki.
6. Sprawdzić wzrost hodowli w 5. dniu lub w późniejszych dniach i zebrać komórki, jeśli zaobserwowano wystarczającą liczbę kolonii.
7. Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowle pożywką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

Stosowanie pożywki CHANG Amnio dla hodowli pierwotnych: metody hodowli w butelkach hodowlanych
1. Wirować płyn owodniowy przy prędkości około 1200 rpm przez 10 minut, aby zatężyć komórki.
2. Zaaspirować nadsącz z odwirowanej probówki, 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 pożywki CHANG Amnio do całkowitej objętości równej 5 ml na butelkę. Jeśli próbkę pobrano od pacjentki w trzecim trymestrze ciąży, osadu może być więcej, ale może on zawierać mniej żywe komórki, z tego względu konieczny będzie bardziej stężony posiew (mniej pożywki niż zwykle).
3. Inkubować hodowle w temperaturze 37°C w atmosferze 5%–8% CO_2, nie zakłócając ich.
4. Sprawdzić wzrost hodowli w 5. dniu. Zmienić pożywkę na 2 ml świeżej pożywki CHANG Amnio i zebrać komórki, jeśli zaobserwowano wystarczający wzrost komórek.
5. Po wykonaniu tej czynności codziennie sprawdzać wzrost hodowli i całkowicie wymieniać pożywkę do czasu zaobserwowania wystarczającej liczby kolonii gotowych do zbioru. W przypadku próbek zawierających krew może być konieczne częstsze wymienianie pożywki.
6. Najlepsze wyniki otrzymywano, gdy zasilano hodowle pożywką CHANG Amnio dzień przed zbiorem.

Stosowanie pożywki CHANG Amnio do wzrostu pasażowanych komórek płynu owodniowego:

Aby wykonać pasaż komórek, poddać hodowle działaniu trypsyny (lub pronazy itp.), w taki sam sposób, jak w przypadku komórek rosnących w pożywce standardowej. Jednakże należy ściśle monitorować komórki poddawane działaniu proteazy. Komórki płynu owodniowego rosnące w pożywce CHANG Amnio zwykle są bardziej wrażliwe na działanie proteazy niż gdy rosną w pożywce standardowej. W celu uwzględnienia tego faktu może być konieczne wprowadzenie zmian w protokole.
Uwaga: Wartość pH pożywki używanej do zasilania hodowli musi mieścić się w zakresie 6,65–7,44 (tzn. kolor pożywki musi być lekko żółtawo-łososiowy). Wartość pH można łatwo wyregulować, umieszczając pożywkę w butelce z lekko odkręconą zakrętką w inkubatorze z atmosferą 5–8% CO_2 na około 30 minut.

Uwaga: W pożywce CHANG Amnio często tworzą się kryształy szczawianu wapnia. Nie wykazano, aby obecność tych kryształów wpływała negatywnie na właściwości produktu.

Przygotowanie próbki kosmków kosmówki:
1. Oznaczyć szalkę Petriego danymi identyfikującymi otrzymaną próbkę i w sposób aseptyczny przenieść całą próbkę na szalkę. Dodać 5 ml wstępnie ogrzanej, kompletnej pożywki CHANG Amnio na szalkę i umieścić ją w inkubatorze z atmosferą 5–8% CO_2 nastawionym na temperaturę 35–39°C na 30 minut, aby krew osiadła na dnie.
2. Oczyścić próbkę, korzystając z mikroskopu stereoskopowego. Rozpocząć pracę przy powiększeniu 1,5X, a następnie zwiększyć powiększenie do 3X. Uwaga: Próbka kosmków kosmówki powinna ważyć około 20–40 mg.
3. Używając dwóch sterylnych szczypiec, usunąć z materiału kosmków kosmówki skrzepy krwi i doczesną matki. Pracować na szalce, pod mikroskopem stereoskopowym. Materiał kosmków ma jasny kolor, strukturę kanalikową i/lub guzkowatą z widocznymi gałęziami i żyłami.
4. Przenieść oczyszczone kosmki na nową szalkę Petriego zawierającą wstępnie ogrzaną, kompletną pożywkę CHANG Amnio. Wykonać końcowe oczyszczanie, używając szczypiec do chwytania kosmków i delikatnie wytrząsając je. Uwaga: Idealna ilość próbki na hodowlę to około 5 mg. Uważać, aby nie uszkodzić delikatnych kosmków.
5. Przenieść kosmki i pożywkę do probówki wirówkowej o pojemności 15 ml i dodać 4 krople antybiotyku (tj. siarczanu gentamycyny, 50 µg/ml) do probówki wirówkowej. Pozostawić na 30 minut.
6. Wirować kosmki przy ok. 1400 rpm przez 5 minut.

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

Acest mediu a fost proiectat pentru utilizare în incubatoare cu CO_2 (culturi echilibrate cu o atmosferă cu 5 - 8 % CO_2).

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

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

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

COMPONENTE

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

ASIGURAREA CALITĂȚII

STERILITATE

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

PREGĂTIREA PENTRU UTILIZARE

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

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

REPARTIZAREA CHANG Amnio ÎN PĂRȚI ALICOTE
1. Dezghețați CHANG Amnio în conformitate cu instrucțiunile de mai sus.
2. Distribuiți aseptic în părți alicote de mărime convenabilă și recongelați.
3. Dezghețați 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 flaconaș. 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 însămânțare mai puternică (mai puțin mediu decât în mod normal).
3. Incubați culturile fără a le agita la 37 °C într-o atmosferă de 5 - 8 % CO_2.
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 însămânțare mai puternică (mai puțin mediu decât în mod normal).
3. Incubați culturile fără a le agita la 37 °C într-o atmosferă de 5 - 8 % de CO_2.
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 - 7,44 (adică mediul trebuie să aibă o culoare ușor gălbuie-somon). pH-ul poate fi ajustat cu ușurință punând mediul într-un incubator de 5 - 8 % CO_2 cu capacul ușor slăbit timp de 30 de minute.

Notă: În CHANG Amnio se formează în mod obișnuit cristale de oxalat de calciu. Nu s-a demonstrat că prezența acestor cristale provoacă vreun efect nedorit asupra performanței produsului.

Pregătirea cu probe de vilozități coriale:
1. Etichetați un vas Petri pentru fiecare eprubetă primită și transferați conținutul probei în mod aseptic. Adăugați în vas 5 ml din mediul complet CHANG Amino preîncălzit și puneți-l în incubator timp de 30 de minute la 35 - 39 °C, în atmosferă de 5 - 8 % CO_2, pentru a-i permite sângelui să se depună.
2. Curățați proba folosind un microscop de disecție, mai întâi sub mărire 1,5X, apoi ajustând la o mărire de aproximativ 3X. Notă: Este necesară o probă de vilozități coriale de aprox. 20 - 40 mg.
3. Folosind două perechi de forcepsuri sterile, îndepărtați cheagurile de sânge și orice decidua maternă din materia cu vilozități, în timp ce lucrați în vas, sub microscopul de disecție. Materia cu vilozități este deschisă la culoare, tubulară și/sau cu cocoloașe cu ramuri și vene vizibile.
4. Transferați vilozitățile curate într-un alt vas Petri care conține mediul complet CHANG Amino preîncălzit. Faceți curățarea finală, folosind forcepsuri pentru a apuca vilozitățile și agitați ușor. Notă: Cantitatea ideală de folosit pe cultură este de 5 mg. Aveți grijă să evitați vătămarea vilozităților fragile.
5. Transferați vilozitățile și mediul într-o eprubetă pentru centrifugă de 15 ml și adăugați 4 picături de antibiotic (de ex. sulfat de gentamicină, 50 µl/ml) în eprubeta pentru centrifugă. Lăsați să stea 30 de minute.
6. Centrifugați vilozitățile la aproximativ 1.400 rpm timp de 5 minute.

Pregătirea cu probe de cultură de vilozități coriale:
1. Aspirați supernatantul din eprubeta centrifugată, asigurându-vă că ați lăsat 0,5 ml de mediu deasupra peletei de celule (sau cam de 2 ori volumul peletei).
2. Resuspendați ușor peleta. Adăugați 2 ml de mediu CHANG Amnio preîncălzit în eprubeta pentru centrifugă.
3. Adăugați 2 ml de tripsină EDTA și incubați cultura fără a o agita timp de 10 minute la 35 - 39 °C, într-o atmosferă de 5 - 8 % CO_2. Scoateți eprubeta din incubator, resuspendați peleta și puneți-o la incubator încă 10 minute.
4. Scoateți eprubeta pentru centrifugă din incubator, resuspendați peleta și centrifugați la 1.400 rpm timp de 8 - 10 minute.
5. Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă. Resuspendați peleta, apoi adăugați în eprubetă 1 ml de colagenază și puneți la incubator 5 minute.
6. Scoateți din incubator și controlați vizual dacă peleta este tulbure și dacă nu se pot vedea bucăți individuale distincte de vilozități. Dacă peleta nu este tulbure, puneți la loc în incubator încă 5 minute.
7. Adăugați 3 ml de CHANG Amnio preîncălzit în eprubeta pentru centrifugă pentru a opri acțiunea colagenazei.
8. Centrifugați eprubeta la 1.400 rpm timp de 8 - 10 minute.
9. Aspirați supernatantul din eprubeta pentru centrifugă, lăsând 0,5 ml de mediu deasupra peletei de celule. Resuspendați peleta înainte de a adăuga CHANG Amino folosit pentru pregătire.
10. Stabiliți numărul minim de culturi folosind 0,5 ml de CHANG Amnio per cultură pentru fiecare vas Petri care conține o lamelă.
11. Incubați culturile fără a le agita la 35 - 39 °C într-o atmosferă de 5 - 8 % CO_2.
12. Inundați culturile în ziua 2 prin adăugarea a 1,5 ml de CHANG Amnio preîncălzit.
13. După 4 zile, culturile ar trebui verificate pentru a se vedea dacă există creștere. Dacă se observă creștere, îndepărtați mediul și adăugați 2 ml de CHANG Amnio proaspăt preîncălzit la fiecare lamelă. În continuare culturile ar trebui hrănite la fiecare 2 zile. Pentru probele care conțin sânge, culturile pot necesita înlocuiri mai frecvente ale mediului.
14. Controlați culturile pentru a vedea dacă există creștere în ziua 5 și recoltați atunci când se observă suficiente colonii. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când culturile sunt hrănite cu CHANG Amnio în ziua anterioară recoltării.

DEPOZITARE ȘI STABILITATE

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

PRECAUȚII ȘI 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. primärodling av celler i amnionvätska
2. odling av celler från amnionvätska från passage
3. fast amnionvävnad från chorionvillibiopsi.

Detta medium har tagits fram för användning i en CO_2-inkubator (kulturerna ekvilibreras i en atmosfär med 5–8 % CO_2).

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 primärodling 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

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

KVALITETSSÄKRING

STERILITET

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

BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

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

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

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

BRUKSANVISNING

Användning av CHANG Amnio för primärkulturer: *in situ*-metoder
1. Centrifugera amnionvätskan 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 utsådd (mindre medium än normalt).
3. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 37 °C i 5–8 % CO_2-atmosfär.
4. Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 2 ml CHANG Amnio.
5. Efter 4–5 dagar bör kulturerna kontrolleras med avseende på växt. Näring bör tillföras till kulturerna så snart växt har observerats. Tillför näring till kulturerna genom att avlägsna all supernatant från kulturen och ersätta den med 2 ml färskt CHANG Amnio. Det rekommenderas att därefter tillföra näring till kulturerna varannan dag. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
6. Kontrollera kulturerna med avseende på växt på eller efter dag 5 och skörda dem när tillräckligt många kolonier observeras.
7. Bästa resultat erhålls när kulturerna tillförs näring med CHANG Amnio dagen innan de skördas.

Användning av CHANG Amnio för primärkulturer: Metoder med flaska
1. Centrifugera amnionvätskan 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 utsådd (mindre medium än normalt).
3. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 37 °C i 5–8 % CO_2-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 noga 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_2-inkubator med locket något lossat, under cirka 30 minuter.

Anm: Kalciumoxalatkristaller bildas ofta i CHANG Amnio. Närvaron av dessa kristaller har inte visats inverka negativt på produktens funktion.

Preparering av prov från chorionvillibiopsi:
1. Märk en petriskål för varje erhållet prov och överför biopsiinnehållet med aseptisk teknik. Tillsätt 5 ml av det förvärmda CHANG Amnio komplett medium till skålen och ställ in skålen i inkubatorn i 30 minuter vid 35–39 °C, 5–8 % CO_2-atmosfär, för att låta blodet sjunka till botten.
2. Rensa provet under ett dissektionsmikroskop, först med 1,5X förstoring och därefter med cirka 3X förstoring. Anm: En mängd på cirka 20–40 mg chorionvillibiopsi krävs.
3. Arbeta i skålen under dissektionsmikroskopet och avlägsna blodkoagler och eventuell maternell decidua från villusmaterialet med hjälp av två par sterila pincetter. Villusmaterial har ljus färg, är tubulärt och/eller hopklumpat med synliga grenar och vener.
4. Överför rena villi till en annan petriskål med förvärmt CHANG Amnio komplett medium. Utför en slutlig rensning genom att fatta tag i villi med en pincett och försiktigt skaka dem. Anm: Idealisk mängd är 5 mg per kultur. Undvik noga att skada de sköra villi.
5. Överför villi och medium till ett 15 ml centrifugrör och tillsätt 4 droppar antibiotikum (dvs. gentamicinsulfat, 50 µl/ml) till centrifugröret. Låt stå i 30 minuter.
6. Centrifugera villi vid cirka 1 400 rpm under 5 minuter.

Odling av chorionvillibiopsi:
1. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men se till att lämna kvar cirka 0,5 ml medium (eller cirka 2 X cellpelletens volym) ovanför cellpelleten.
2. Resuspendera pelleten försiktigt. Tillsätt 2 ml förvärmt CHANG Amnio-medium till centrifugröret.
3. Tillsätt 2 ml trypsin EDTA och inkubera kulturerna, utan att störa dem, i 10 minuter vid 35–39 °C i 5–8 % CO_2-atmosfär. Ta ut röret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och placera röret i inkubatorn i 10 minuter till.
4. Ta ut centrifugröret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och centrifugera i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
5. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret. Resuspendera pelleten, tillsätt därefter 1 ml kollagenas till röret och sätt in röret i inkubatorn i 5 minuter.
6. Ta ut röret ur inkubatorn och se efter om pelleten är grumlig och att inga distinkta stycken av enstaka villi kan ses. Om pelleten inte är grumlig, sätt tillbaka röret i inkubatorn i 5 minuter till.
7. Tillsätt 3 ml förvärmt CHANG Amnio till centrifugröret för att stoppa kollagenasets aktivitet.
8. Centrifugera röret i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
9. Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar 0,5 ml medium ovanför cellpelleten. Resuspendera pelleten före tillsättning av CHANG Amnio som använts för preparering.
10. Preparera ett optimalt antal kulturer med användning av 0,5 ml CHANG Amnio per kultur för varje petriskål som innehåller ett täckglas.
11. Inkubera kulturerna, utan att störa dem, vid 35–39 °C i 5–8 % CO2-atmosfär.
12. Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 1,5 ml förvärmt CHANG Amnio.
13. Efter 4 dagar bör kulturerna kontrolleras med avseende på växt. Om växt observeras, avlägsna mediet och tillsätt 2 ml färskt förvärmt CHANG Amnio till varje täckglas. Kulturerna bör därefter tillföras näring varannan dag. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
14. Kontrollera kulturerna med avseende på växt på dag 5 och skörda när tillräckligt många kolonier observeras. Bästa resultat erhålls när kulturerna tillförs näring med CHANG Amnio dagen innan de skördas.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvaras fryst vid temperatur under −10 °C. Vid frysförvaring är produkten hållbar fram till det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Oanvänd produkt kan delas upp i alikvoter och frysas på nytt för senare användning, eller förslutas tätt och förvaras vid 2–8 °C i upp till 30 dagar. Den får frysas högst två gånger. Skyddas mot fluorescerande ljus.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Denna produkt är avsedd att användas av personal med utbildning i procedurer som omfattar den indicerade tillämpning för vilken produkten är avsedd.
Flaskor vars sterila förpackning inte är intakt får inte användas.
Använd inte CHANG Amnio efter det utgångsdatum som anges på etiketten.

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.

Sööde on mõeldud kasutamiseks CO_2 inkubaatorites (kultuurid ekvilibreeritud 5–8% CO_2 atmosfääriga).

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 gentamitsiinsulfaat (50 µg/ml).

OSAD

Puhvrid	Valgud, hormoonid	Nukleiinhapped
Naatriumvesinik-	ja kasvufaktorid	Deoksüadenosiin
karbonaat	Veiseloote päritolu	Deoksütsütidiin
	seerum (FBS)	Deoksüguanosiin
Antioksüdant	Vastsündinud veise	Adenosiin
Lipoehape	päritolu seerum	Tsütidiin
	Inimese transferriin	Guanosiin
Antibiootikum	Fibroplastide	Tümidiin
Gentamitsiinsulfaat	kasvufaktor (FGF)	Uridiin
	Insuliin	
Aminohape	Progesteroon	Muu
Alaniin	Testosteroon	Etüülalkohol
Arginiin	Beeta-östradiool	Türoniin
Asparagiin	Hüdrokortisoon	
Asparagiinhape		Vitamiinid ja
Tsüsteiin	pH-indikaator	mikroelemendid
Glutamiinhape	Fenoolpunane	Askorbiinhape
Glutamiin		Foolhape
Glütsiin	Energia substraadid	Nikotiinamiid
Histidiin	Glükoos	Riboflaviin
Isoleutsiin	Püruvaat	Tiamiin
Leutsiin	Inositool	Pantoteenhape
Lüsiin		Kobalamiin
Metioniin	Soolad ja ioonid	Püridoksiin
Fenüülalaniin	Naatriumkloriid	Biotiin
Proliin	Naatriumseleniit	
Seriin	Kaltsiumkloriid	Vesi
Treoniin	Koliinkloriid	WFI kvaliteet
Trüptofaan	Kaaliumkloriid	
Türosiin	Kaaliumfosfaat	
Valiin	Magneesiumsulfaat	
	Naatriumfosfaat	

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 µ filtri. Toote CHANG Amnio proove on võimaliku bakterioloogilise saaste suhtes testitud steriilsuse katseprotokolli järgi, mida on kirjeldatud kehtivas USP steriilsustestis <71>.

ETTEVALMISTUSED KASUTAMISEKS

Sulatage toatemperatuuril steriilsel töölaual või asetades pudel 37 °C veevanni.

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

CHANG Amnio kasutamine primaarkultuuride puhul: *in situ* metodoloogiad
1. Tsentrifuugige 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) alfafetoproteiinini (AFP) ja atsetüülkoliinesteraasi analüüsideks. Kui proovis on verd, valmistage lisaalikvoot 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 suurusest) 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 söödet).
3. Inkubeerige kultuure puutumatult 37 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris.
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 värske 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. Tsentrifuugige 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) alfafetoproteiinini (AFP) ja atsetüülkoliinesteraasi analüüsideks. Kui proovis on verd, valmistage lisaalikvoot 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 söödet).
3. Inkubeerige kultuure puutumatult 37 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris.
4. 5. päeval kontrollige kasvu. Vahetage sööde 2 ml värske 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 pronaasiga vms) nagu tavapärasel rakkude kasvatamisel tavalises söötmes. Proteaasiga töötlemist tuleb hoolikalt jälgida. CHANG Amniosis kasvatatud lootevedeliku rakud kipuvad olema proteaasitöötluse suhtes tundlikumad kui tavapärases söötmes kasvatatud lootevedeliku rakud. Sellega arvestamiseks tuleb võib-olla muuta protokolli.
Märkus. Kultuuride söötmiseks kasutatava söötme pH peab jääma vahemikku 6,65–7,44 (st söötme värvus peab olema kergelt kollakas-roosa). pH-d saab kergesti reguleerida, kui asetada sööde 5–8% CO_2 inkubaatorisse, jättes korgi kergelt avatuks umbes 30 minutiks.

Märkus. CHANG Amnio sees moodustuvad tavaliselt kaltsiumoksalaadi kristallid. Nende kristallide esinemine ei ole põhjustanud kahjulikku toimet toote jõudlusele.

Koorioni hattude proovi ettevalmistamine
1. Märkige iga saadud proovi kohta Petri tass ja viige proovi sisu üle aseptiliselt. Lisage tassi 5 ml eelsoojendatud CHANG Amino valmissöödet ning asetage see 30 minutiks inkubaatorisse 35–39 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris, et lasta verel settida.
2. Puhastage proov stereomikroskoobi abil, kasutades esialgu 1,5-kordset ning seejärel 3-kordset suurendust. Märkus. Vajalik on umbes 20–40 mg koorioni hattude proovi.
3. Eemaldage stereomikroskoobi all hattude seast kahe paari steriilsete pintsettide abil vereklombid ja emaka epiteelkoed. Hatud on heledat värvi, torujad ja/või tombulised esileküündivate harude ning soontega.
4. Viige puhtad hatud üle teise Petri tassi, mis sisaldab eelsoojendatud CHANG Amnio valmissöödet. Tehke lõplik puhastamine, kasutades hattudest kinnihaaramiseks pintsette, ja loksutage seejärel tasakesi. Märkus. Kõige sobilikum kogus ühe kultuuri kohta on 5 mg. Ärge kahjustage hapraid hatte.
5. Viige hatud ja sööde üle 15 ml tsentrifuugikatsutisse ja lisage sellesse 4 tilka antibiootikumi (st gentamitsiinsulfaati, 50 µl/ml). Laske 30 minutit seista.
6. Tsentrifuugige hatte kiirusel u 1400 p/min 5 minutit.

Koorioni hattude proovi kultuur
1. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupelleti peale umbes 0,5 ml söödet (või umbes kahekordse pelleti koguse).
2. Resuspendeerige pellet õrnalt. Lisage tsentrifuugikatsutisse 2 ml eelsoojendatud CHANG Amnio söödet.
3. Lisage 2 ml trüpsiin-EDTA-d ja inkubeerige kultuuri puutumatult 35–39 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris 10 minutit. Eemaldage katsuti inkubaatorist, resuspendeerige pellet ja asetage veel 10 minutiks inkubaatorisse.
4. Eemaldage inkubaatorist tsentrifuugikatsuti, suspendeerige rakupelletit uuesti ja tsentrifuugige 8–10 minutit 1400 p/min juures.
5. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant. Resuspendeerige pellet, lisage katsutisse 1 ml kollagenaasi ja asetage 5 minutiks inkubaatorisse.
6. Eemaldage see inkubaatorist ja kontrollige visuaalselt, kas rakupellet on hägune ja kas selles on näha märgatavaid hattude tükke. Kui rakupellet ei ole hägune, asetage see veel 5 minutiks tagasi inkubaatorisse.
7. Lisage tsentrifuugikatsutisse 3 ml eelsoojendatud CHANG Amnio söödet, et peatada kollagenaasi toimimine.
8. Tsentrifuugige katsutit 8–10 minutit 1400 p/min juures.
9. Aspireerige tsentrifuugitud katsutist supernatant, jättes rakupelleti peale umbes 0,5 ml söödet. Resuspendeerige pellet enne lisamist ettevalmistamisel kasutatud CHANG Amnio.
10. Valmistage ette optimaalne arv kultuure, kasutades iga kultuuri kohta 0,5 ml toodet CHANG Amnio iga Petri tassi puhul, mis sisaldab slaidi.
11. Inkubeerige kultuure puutumatult 35–39 °C juures 5–8% CO_2 atmosfääris.
12. 2. päeval katke kultuurid üle 1,5 ml eelsoojendatud tootega CHANG Amnio.
13. 4 päeva järel tuleb kontrollida kultuuride kasvu. Kui tuvastate rakukasvu, eemaldage sööde ja lisage igale slaidile 2 ml värsket eelsoojendatud toodet CHANG Amnio. Seejärel toitke kultuure iga 2 päeva järel. Veriste proovide korral võivad kultuurid vajada sagedasemat söötmevahetust.
14. Kontrollige kultuuride kasvu 5. päeval ning koguge, kui tuvastate piisavad kolooniad. 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 tööalikvootidesse 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 fluorestsents-valguse 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:
1. az amniotikus folyadék sejtjeinek elsődleges tenyésztése;
2. az amniotikus folyadék passzált sejtjeinek növesztése;
3. szilárd amnionszövet mintavételezése chorionbolyhokból.

Ezt a médiumot CO_2-inkubátorokban (5–8%-os CO_2-atmoszférával ekvilibrált tenyészetekkel) 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 chorionboholy-mintáknak (chorionic villus sampling, CVS) és a fogamzás termékeinek (products of conception, POC) elsődleges tenyésztéséhez, a kariotípus meghatározásához és más prenatális genetikai vizsgálatokhoz. Flaska és *in situ* módszerekhez is optimalizálták. A termék gentamicin-szulfát antibiotikumot (50 µg/ml) tartalmaz.

ÖSSZETEVŐK

Pufferek	Fehérjék, hormonok	Kálium-klorid
Nátrium-bikarbonát	és növekedési	Kálium-foszfát
	faktorok	Magnézium-szulfát
Antioxidáns	Magzati	Nátrium-foszfát
Tioktánsav	szarvasmarha	
	szérum (fetal bovine	Nukleinsavak
Antibiotikum	serum, FBS)	Dezoxi-adenozin
Gentamicin-szulfát	Újszülött	Dezoxi-citidin
	szarvasmarha	Dezoxi-guanozin
Aminosav	szérum	Adenozin
Alanin	Humán transzferrin	Citidin
Arginin	Fibroblaszt	Guanozin
Aszparagin	növekedési faktor	Timidin
Aszparaginsav	(fibroblast growth	Uridin
Cisztein	factor, FGF)	
Glutaminsav	Inzulin	Egyéb
Glutamin	Progeszteron	Etil-alkohol
Glicin	Tesztoszteron	Tironin
Hisztidin	Béta-ösztradiol	
Izoleucin	Hidrokortizon	Vitaminok
Leucin		és nyomelemek
Lizin	pH-indikátor	Aszkorbinsav
Metionin	Fenolvörös	Folsav
Fenilalanin		Nikotinamid
Prolin	Energiaszubsztrátok	Riboflavin
Szerin	Glükóz	Tiamin
Treonin	Piruvát	Pantoténsav
Triptofán	Inozitol	Kobalamin
Tirozin		Piridoxin
Valin	Sók és ionok	Biotin
	Nátrium-klorid	
	Nátrium-szelenit	Víz
	Kalcium-klorid	Injekcióhoz való
	Kolin-klorid	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 szűréssel történt. A CHANG Amnio mintáit a jelenlegi Amerikai Gyógyszerkönyv sterilitási vizsgálatában <71> leírt sterilitásvizsgálati protokollt követve tesztelik a lehetséges bakteriológiai szennyeződésre.

ELŐKÉSZÍTÉS A FELHASZNÁLÁSRA

Steril pultfelületen, szobahőmérsékleten olvassza ki, vagy pedig úgy, hogy az üveget 37 °C-os vízfürdőbe helyezi.

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

A CHANG Amnio SZÉTOSZTÁSA
1. Olvassza fel a CHANG Amnio médiumot a fenti utasítások szerint.
2. Aszeptikusan ossza a kívánt méretű alikvotokra, és fagyassza le újra.
3. Olvassza fel az alikvotokat 37 °C-os vízfürdőben, amikor a felhasználásukra készen áll.

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A CHANG Amnio használata elsődleges tenyészetekhez: *in situ* módszerek
1. Centrifugálja az amniotikus folyadékot körülbelül 1200 rpm-mel 10 percig a sejtek koncentrálásához.
2. Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml-t hagyva a centrifugált amniotikus folyadék sejtpellete 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 sejtpelletet a beteg saját amniotikus folyadékának kis mennyiségében. Adjon elegendő CHANG Amnio médiumot a koncentrált sejtszuszpenzióhoz úgy, hogy a végső szélesztési térfogat fedőlemezenként 0,5 ml (összesen 4 fedőlemez, a sejtpellet méretétől függően) vagy flaskánként 2 ml legyen. Ha a minta a terhesség harmadik trimeszterében lévő betegtől származik, akkor a pellet nagyobb lehet, de kevesebb életképes sejtet tartalmaz, így nagyobb oltásra van szükség (a normálisnál kevesebb médium).
3. Inkubálja a tenyészeteket zavartalanul 37 °C-on, 5–8%-os CO_2-atmoszférában.
4. Árassza el a tenyészeteket a 2. napon 2 ml CHANG Amnio hozzáadásával.
5. 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 gyakrabb médiumcserét igényelhetnek.
6. Ellenőrizze a tenyészetek növekedését az 5. napon vagy azt követően, és amikor elegendő kolónia figyelhető meg, végezze el az összegyűjtést.
7. A legjobb eredmények úgy érhetőek el, ha a tenyészeteket az összegyűjtés előtti napon CHANG Amnio médiummal táplálják.

A CHANG Amnio felhasználása elsődleges tenyésztéshez: Flaska módszerek
1. Centrifugálja az amniotikus folyadékot körülbelül 1200 rpm-mel 10 percig a sejtek koncentrálásához.
2. Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml-t hagyva a centrifugált amniotikus folyadék sejtpellete 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 sejtpelletet 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 betegtől származik, akkor a pellet nagyobb lehet, de kevesebb életképes sejtet tartalmaz, így nagyobb oltásra van szükség (a normálisnál kevesebb médium).
3. Inkubálja a tenyészeteket zavartalanul 37 °C-on, 5–8%-os CO_2-atmoszférában.
4. Ellenőrizze a növekedést az 5. napon. Cserélje ki a médiumot 2 ml friss CHANG Amnio médiumra, és ha elegendő sejtnövekedés figyelhető meg, végezze el az összegyűjtést.
5. 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 gyakrabb médiumcserét igényelhetnek.
6. A legjobb eredmények úgy érhetőek el, ha a tenyészeteket az összegyűjtés előtti napon CHANG Amnio médiummal táplálják.

A CHANG Amnio felhasználása az amniotikus folyadék passzált sejtjeinek növesztéséhez:

A sejtek passzálásához kezelje a tenyészeteket tripszinnel (vagy pronázzal stb.), 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_2-inkubátorba teszi körülbelül 30 percre, enyhén meglazított kupakkal.

Megjegyzés: A CHANG Amnio médiumban gyakran képződnek kalcium-oxalát kristályok. A kristályok jelenlétéről nem mutatták ki, hogy bármilyen káros hatással lenne a termék teljesítményére.

A chorionboholy-minták előkészítése:
1. Minden érkezett mintához címkézzen fel egy Petri-csészét, majd aszeptikus módon helyezze bele a minta tartalmát. Adjon 5 ml előmelegített CHANG Amnio teljes médiumot a csészéhez, és helyezze inkubátorba 30 percre, 35–39 °C-on, 5–8% CO_2-atmoszférában, hogy a vér leülepedhessen.
2. Sztereomikroszkóppal tisztítsa meg a mintát, először 1,5-szeres nagyítás mellett, majd erről körülbelül 3-szoros nagyításra igazítva. Megjegyzés: Körülbelül 20–40 mg chorinboholy-mintára van szükség.
3. A csészén belül dolgozva, sztereomikroszkóp alatt, két steril fogóval távolítsa el a vérrögöket és az anyai deciduát a chorionbolyhokról. A bolyhok anyaga világos színű, csőszerű és csomós, látható elágazásokkal és erekkel.
4. A tiszta bolyhokat helyezze át másik, előmelegített CHANG Amnio teljes médiumot tartalmazó Petri-csészébe. Végezze el a végső tisztítást: fogóval fogja meg a bolyhokat, és finoman rázogassa meg őket. Megjegyzés: Tenyészetenként 5 mg az ideális mennyiség. Legyen óvatos, hogy ne károsítsa a törékeny bolyhokat.
5. A bolyhokat és a médiumot helyezze át 15 ml-es centrifugacsőbe, és adjon 4 csepp antibiotikumot (pl. gentamicin-szulfátot, 50 µl/ml) a centrifugacsőhöz. Pihentesse 30 percig.
6. Centrifugálja a bolyhokat 5 percig 1400 rpm-en.

A chorionboholy-minták tenyészete:
1. Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből. Fontos, hogy körülbelül 0,5 ml médiumot hagyjon a sejtpellet felett (vagy körülbelül a pellet térfogatának 2-szeresét).
2. Szuszpendálja fel újra óvatosan a pelletet. Helyezzen 2 ml előmelegített CHANG Amnio médiumot a centrifugacsőbe.
3. Adjon hozzá 2 ml tripszin EDTA-t, és inkubálja a tenyészetet 10 percig zavartalanul 35–39 °C-on, 5–8%-os CO_2-atmoszférában. Vegye ki a csövet az inkubátorból, szuszpendálja újra a pelletet, és helyezze inkubátorba újabb 10 percre.
4. Vegye ki a centrifugacsövet az inkubátorból, szuszpendálja fel újra a pelletet, és centrifugálja 8–10 percig 1400 rpm-en.
5. Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből. Szuszpendálja fel újra a pelletet, majd adjon 1 ml kollagenázt a csőhöz, és helyezze inkubátorba 5 percre.
6. Vegye ki az inkubátorból, és szemrevételezéssel ellenőrizze, hogy a pellet zavaros-e, és hogy nem láthatók-e a különálló bolyhok egyes darabkái. Ha a pellet zavaros, akkor helyezze vissza az inkubátorba további 5 percre.
7. Adjon 3 ml előmelegített CHANG Amnio médiumot a centrifugacsőhöz a kollagenáz működésének leállításához.
8. Centrifugálja a csövet 8–10 percig 1400 rpm-en.
9. Szívja le a felülúszót a centrifugált csőből, körülbelül 0,5 ml médiumot hagyva a sejtpellet felett. Szuszpendálja fel újra a pelletet, mielőtt hozzáadja az előkészítéshez használt CHANG Amnio médiumot.
10. A fedőlemezzel ellátott Petri-csészéknél készítsen elő megfelelő számú tenyészetet, tenyészetenként 0,5 ml CHANG Amnio médium használata.
11. Inkubálja a tenyészetet zavartalanul 35–39°C-on, 5–8%-os CO_2-atmoszférában.
12. Árassza el a tenyészeteket a 2. napon 1,5 ml előmelegített CHANG Amnio hozzáadásával.
13. A 4. napon ellenőrizni kell a tenyészetek növekedését. Megfigyelt növekedés esetén távolítsa el a médiumot, és adjon 2 ml friss, előmelegített CHANG Amnio médiumot minden egyes fedőlemezhez. A tenyészeteket ezután 2 naponta táplálja. Véres minták esetén a tenyészetek gyakrabb médiumcserét igényelhetnek.
14. 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 táplálják.

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

Fagyasztva, –10 °C alatt tárolja. A termék stabil az üveg címkéjén feltüntetett lejárati időpontig, amennyiben fagyasztva tárolják. A fel nem használt termék munkaalikvotokra 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.

ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

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 glutaminu papildyta „CHANG Amnio" terpė gali būti naudojama pagal tokią paskirtį:
1. amniono skysčio ląstelių pirminei kultūrai;
2. auginant perkeltas amniono skysčio ląsteles;
3. tvirto amniono audiniui, gautam paėmus chorioninių išaugų (gaurelių) méginius.

Ši terpė buvo sukurta naudoti CO_2 inkubatoriuose (pasėlių pusiausvyros būsena pasiekta 5–8 % CO_2 aplinkoje).

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).

SUDEDAMOSIOS DALYS

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

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

STERILUMAS

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

PARUOŠIMAS NAUDOTI

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

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

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

NAUDOJIMO NURODYMAI

„CHANG Amnio" terpės naudojimas pirminiams pasėliams: *in situ* 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 méginys 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 stikleliu tenkantis tūris būtų 0,5 ml (iš viso 4 dengiamieji stikleliai, priklausomai nuo ląstelių nuosėdų) arba po 2 ml vienam flakonėliui. Jei méginys 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. Pasėlius netrukdomai inkubuokite 37 °C temperatūroje 5–8 % CO_2 aplinkoje.
4. 2-ą dieną ant kultūrų užliekite po 2 ml „CHANG Amnio" terpės.
5. Praėjus 4–5 dienoms, reikia patikrinti kultūrų augimą. Pastebėjus, kad kultūros auga, jas reikia maitinti. Kultūras maitinkite nusiurbdami visą virš pasėlio susidariusį supernatantą ir jį pakeisdami 2 ml šviežios „CHANG Amnio" terpės. Po to kultūras rekomenduojama maitinti kas 2 dienas. Jei méginiai 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 pasiekiama „CHANG Amnio" terpe 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 méginys kraujingas, paruoškite papildomą porciją tolesniems tyrimams. Nusėdusias ląsteles resuspenduokite nedideliame pačios pacientės vaisiaus vandenų kiekyje. Įpilkite 4 ml „CHANG Amnio" terpės, kad kiekviename flakone susidarytų bendras 5 ml tūris. Jei méginys 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. Pasėlius netrukdomai inkubuokite 37 °C temperatūroje 5–8 % CO_2 aplinkoje.
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 méginiai buvo kraujingi, kultūroms gali prireikti dažniau keisti terpę.
6. Geriausių rezultatų pasiekiama „CHANG Amnio" terpe 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 jautriau reaguoti į apdorojimą proteazėmis negu įprastinėje terpėje augintos vaisiaus vandenų ląstelės. Gali prireikti pakeisti protokolą, kad galėtumėte atsižvelgti į šį faktą.

Pastaba. Paséliams 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_2 inkubatoriuje su šiek tiek atsuktu dangteliu.

Pastaba. Dažnai „CHANG Amnio" terpėje susidaro kalcio oksalato kristalai. Nenustatyta, kad šių kristalų buvimas kaip nors pakenktų produkto funkcinėms savybėms.

Chorioninių gaurelių mėginio paruošimas
1. Pažymėkite kiekvieno gauto méginio petri lėkštelę ir steriliu būdu perkelkite méginio turinį. Pridėkite į lėkštelę 5 ml pašildytos „CHANG Amnio" visapusiškos terpės ir įdėkite į inkubatorių 30 minučių 35–39 °C temperatūroje, 5–8 % CO_2 aplinkoje, kad kraujas nusistovėtų.
2. Išvalykite méginį, naudodami preparavimo lupą, pradžioje didindami 1,5 karto, po to didindami maždaug 3 kartus. Pastaba. Reikia maždaug 20–40 mg chorioninių gaurelių méginio.
3. Dviem steriliomis žnyplėmis išimkite kraujo krešulius ir bet kokius placentos likučius iš gaurelių, dirbdami lėkštelėje po preparavimo lupa. Gaurelių medžiaga yra šviesios spalvos, kanalėlių ir (arba) gumulėlių formos su matomomis atšakomis ir venomis.
4. Perkelkite švarius gaurelius į kitą petri lėkštelę, kurioje yra pašildyta „CHANG Amnio" visos sudėties terpė. Atlikite baigiamąjį valymą, žnyplėmis suimkite gaurelius ir švelniai pamaišykite. Pastaba. Vienam paséliui būtų tinkamiausia naudoti 5 mg kiekį. Saugokitės, kad nepažeistumėte trapių gaurelių.
5. Perkelkite gaurelius ir terpę į 15 ml centrifugavimo mėgintuvėlį ir įlašinkite 4 lašus antibiotiko (t. y. gentamicino sulfato, 50 µl/ml) į centrifugavimo mėgintuvėlį. Palaukite 30 minučių.
6. Centrifuguokite gaurelius 5 minutes esant apyt. 1400 aps./min.

Chorioninių gaurelių méginio pasėlis
1. Nusiurbkite viršnuosėdinį skystį iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami 0,5 ml terpės virš ląstelių nuosėdų (arba apie 2 k. už ląstelių nuosėdų tūrį didesnį kiekį).
2. Atsargiai resuspenduokite nuosėdas. Į centrifuginį mėgintuvėlį įpilkite 2 ml pašildytos „CHANG Amnio" terpės.
3. Įpilkite 2 ml tripsino EDTA ir pasėlį netrukdomai 10 minučių inkubuokite 35–39 °C temperatūroje 5–8 % CO_2 aplinkoje. Išimkite mėgintuvėlį iš inkubatoriaus, resuspenduokite ląstelių nuosėdas ir padėkite į inkubatorių dar 10 minučių.
4. Išimkite centrifuginį mėgintuvėlį iš inkubatoriaus, resuspenduokite ląstelių nuosėdas ir 8–10 minučių centrifuguokite 1400 aps./min. greičiu.
5. Nusiurbkite supernatantą iš centrifuginio mėgintuvėlio. Resuspenduokite ląstelių nuosėdas, tada į mėgintuvėlį įpilkite 1 ml kolagenazės ir padėkite į inkubatorių 5 minutėms.
6. Išimkite iš inkubatoriaus ir apžiūrėkite, ar ląstelių nuosėdos drumstos ir ar nesimato atskirų gaurelių dalių. Jei ląstelių nuosėdos nedrumstos, padėkite atgal į inkubatorių dar 5 minutėms.
7. Įpilkite 3 ml pašildytos „CHANG Amnio" terpės į centrifuginį mėgintuvėlį, kad kolagenazė būtų sustabdyta.
8. Mėgintuvėlį 8–10 minučių centrifuguokite 1400 aps./min. greičiu.
9. Nusiurbkite viršnuosėdinį skystį iš centrifuginio mėgintuvėlio, palikdami 0,5 ml terpės virš ląstelių nuosėdų. Prieš įpildami paruošti naudotos „CHANG Amnio" terpės resuspenduokite ląstelių nuosėdas.
10. Nustatykite optimalų kultūrų skaičių, naudodami 0,5 ml „CHANG Amnio" kultūrai kiekvienoje petri lėkštelėje su dengiamuoju stikleliu.
11. Pasėlius netrukdomai inkubuokite 35–39 °C temperatūroje 5–8 % CO_2 aplinkoje.
12. 2-ą dieną ant pasėlių užliekite po 1,5 ml pašildytos „CHANG Amnio" terpės.
13. Praėjus 4 dienoms, reikia patikrinti kultūrų augimą. Pastebėję ląstelių augimą, pašalinkite terpę ir po kiekvienu dengiamuoju stikleliu pridėkite 2 ml šviežio pašildytos „CHANG Amnio" terpės. Po to kultūras maitinkite kas 2 dienas. Jei méginiai buvo kraujingi, kultūroms gali prireikti dažniau keisti terpę.
14. 5-ą dieną patikrinkite kultūrų augimą ir aptikę pakankamai kolonijų ląsteles surinkite. Geriausių rezultatų pasiekiama „CHANG Amnio" terpe 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 išpilstyti darbinėmis dalimis ir vėl užšaldyti vėlesniam naudojimui arba sandariai uždengus laikyti 2 °C–8 °C temperatūroje iki 30 dienų; galima užšaldyti daugiausia du kartus. Saugoti nuo fluorescencinių spindulių.

ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

Ši priemonė yra skirta naudoti darbuotojams, išmokytiems atlikti procedūras, susijusias su priemonės taikymu pagal numatytą paskirtį.
Nenaudokite produkto, jei pažeista sterili buteliuko pakuotė.
Nenaudokite „CHANG Amnio" terpės pasibaigus etiketėje nurodytam galiojimo laikui.

TÜRKÇE

KULLANIM ENDİKASYONU

Gentamisin ve L-Glutaminli CHANG Amnio şu uygulamalar için kullanılabilir:
1. amniyotik sıvı hücrelerinin primer kültürü
2. pasaj yapılmış amniyotik sıvı hücrelerini üretme
3. koryonik villus örneklemesinden solid amniyotik doku.

Bu vasat CO_2 inkübatörlerinde (%5 - %8 CO_2 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 örnekleme (CVS) ve konsepsiyon ürünlerinin (POC) primer kültürü için komple, kullanıma hazır bir vasattır. Hem flask hem in situ metodolojileri için optimize edilmiştir. Bu ürün Gentamisin Sülfat antibiyotiğini (50 µg/mL) içerir.

BİLEŞENLER

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

KALİTE GÜVENCE

STERİLİTE

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

KULLANIM HAZIRLIĞI

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

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

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

KULLANMA TALİMATI

Primer Kültürler için CHANG Amnio Kullanımı: *in situ* Metodolojiler
1. Hücreleri konsantre etmek için amniyotik sıvıyı 10 dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.
2. Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) santrifüje edilmiş amniyotik sıvı bırakın. Gerekirse alfa-fetoprotein (AFP) ve asetil kolinesteraz testleri için süpernatanı alikotlayın (mümkünse en az 1 mL). Numune kanlıysa ek testler için ek bir alikot hazırlayın. Hücre pelletini hastanın kendi amniyotik sıvısının küçük bir miktarında tekrar süspansiyon haline getirin. Konsantre 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 alınırsa pellet daha büyük olabilir ama daha az canlı hücre içerebilir ve bu nedenle daha yoğun tohumlama gerektirebilir (normalden daha az vasat).
3. Kültürleri ellemeden 37°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
4. Kültürleri gün 2'de 2 mL CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıyla örtün.
5. Kültürlerin 4 - 5 günden sonra üreme açısından kontrol edilmesi gerekir. Kültürler üreme gözlendikten sonra beslenmelidir. Kültürleri tüm kültür süpernatanını alıp yerine 2 mL yeni CHANG Amnio koyarak besleyin. Kültürlerin bundan sonra 2 günde bir beslenmesi önerilir. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
6. Kültürleri 5. günden sonra üreme için kontrol edin ve yeterli koloni gözlenince toplayın.
7. En iyi sonuçlar kültürlerin toplama öncesi günde CHANG Amnio ile beslenmesiyle alınır.

Primer Kültürler için CHANG Amnio Kullanımı: Flask Metodolojileri
1. Hücreleri konsantre etmek için amniyotik sıvıyı 10 dakika boyunca yaklaşık 1200 devir/dk hızında santrifüjleyin.
2. Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde yaklaşık 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) santrifüje edilmiş amniyotik sıvı bırakın. Gerekirse alfa-fetoprotein (AFP) ve asetil kolinesteraz testleri için süpernatanı alikotlayın (mümkünse en az 1 mL). Numune kanlıysa ek testler için ek bir alikot hazırlayın. Hücre pelletini hastanın kendi amniyotik sıvısının küçük bir miktarında tekrar süspansiyon haline getirin. Flask başına toplam 5 mL hacim için 4 mL CHANG Amnio ekleyin. Numune gebeliğin 3. trimesterindeki bir hastadan alınırsa pellet daha büyük olabilir ama daha az canlı hücre içerebilir ve bu nedenle daha yoğun tohumlama gerektirebilir (normalden daha az vasat).
3. Kültürleri ellemeden 37°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
4. Gün 5'te üreme için kontrol edin. Vasatı 2 mL yeni CHANG Amnio ile değiştirin ve yeterli hücre üremesi gözlenirse toplayın.
5. Kültürlerin üreme durumunu kontrol edin ve bundan sonra yeterli koloni gözlenene ve toplamaya hazır olana kadar her gün vasatı tamamen değiştirin. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
6. En iyi sonuçlar kültürlerin toplama öncesi günde CHANG Amnio ile beslenmesiyle alınır.

Pasaj Yapılmış Amniyotik Sıvı Hücrelerini Büyütmek için CHANG Amnio kullanımı:

Hücre pasajı yapmak için kültürlere 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_2 inkübatörüne yerleştirerek kolayca ayarlanabilir.

Not: CHANG Amnio içinde sıklıkla Kalsiyum Oksalat kristalleri oluşur. Bu kristallerin varlığının ürün performansı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olduğu gösterilmemiştir.

Koryonik Villus Örneği Hazırlama:
1. Alınan her numune için bir petri tabağını etiketleyin ve örnek içeriğini aseptik olarak aktarın. Tabağa 5 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio komple vasatından ekleyin ve kanın çökmesini sağlamak üzere 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferinde bir inkübatöre 30 dakika yerleştirin.
2. Numuneyi bir diseksiyon mikroskobu altında başlangıçta 1,5x büyütmeyle ve sonra yaklaşık 3x büyütmeyle temizleyin. Not: Yaklaşık 20 - 40 mg koryonik villus örneği gerekecektir.
3. İki steril forseps kullanarak diseksiyon mikroskobu altında tabak içinde çalışma yoluyla villus materyalinden herhangi bir maternal desidua materyalini ve kan pıhtılarını giderin. Villus materyali görünür dallar ve toplardamarlarla birlikte açık renkli ve tübüler ve/veya topaklı durumdadır.
4. Temiz villusları önceden ısıtılmış CHANG Amnio komple vasatı içeren başka bir petri tabağına aktarın. Villusları tutup yavaşça ajitasyon yapmak için forseps kullanarak son bir temizlik yapın. Not: Kültür başına kullanmak için ideal miktar 5 mg'dır. Narin villuslara zarar vermekten kaçınmak için dikkatli olun.
5. Villuslar ve vasatı bir 15 mL santrifüj tüpüne aktarın ve santrifüj tüpüne 4 damla antibiyotik (örn. Gentamisin Sülfat, 50 µL/mL) ekleyin. 30 dakika bırakın.
6. Villusları 5 dakika boyunca yaklaşık 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.

Koryonik Villus Örneği Kültürü:
1. Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 mL (veya yaklaşık olarak pellet hacminin 2 katı) vasat bıraktığınızdan emin olun.
2. Pelleti yavaşça tekrar süspansiyon haline getirin. Santrifüj tüpüne önceden ısıtılmış 2 mL CHANG Amnio vasatı ekleyin.
3. 2 mL Tripsin EDTA ekleyin ve kültürü bozulmadan 10 dakika boyunca 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin. Tüpü inkübatörden çıkarın, pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve inkübatöre 10 dakika daha koyun.
4. Santrifüj tüpünü inkübatörden çıkarın, pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.
5. Süpernatanı santrifüjlenmiş tüpten aspire edin. Pelleti tekrar süspansiyon haline getirin ve sonra tüpe 1 mL kollajenaz ekleyip 5 dakikalığına inkübatöre koyun.
6. İnkübatörden çıkarın ve pelletin bulanık olup olmadığını ve ayrı villus parçalarının görülüp görülemediğini görsel olarak doğrulayın. Pellet bulanık değilse 5 dakikalığına daha tekrar inkübatöre koyun.
7. Kollajenaz etkisini durdurmak için santrifüj tüpüne 3 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyin.
8. Tüpü 8 - 10 dakika boyunca 1400 devir/dk hızında santrifüjleyin.
9. Santrifüje edilmiş tüpten süpernatanı aspire edip hücre pelleti üzerinde 0,5 mL vasat bırakın. Kurulum için kullanılan CHANG Amnio eklemeden önce pelleti süspansiyon haline getirin.
10. Bir lamel içeren her petri tabağı için kültür başına 0,5 mL CHANG Amnio kullanarak optimum sayıda kültür oluşturun.
11. Kültürleri ellemeden 35°C - 39°C'de %5 - %8 CO_2 atmosferi altında inkübe edin.
12. Kültürleri gün 2'de 1,5 mL önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyerek tamamen sıvıyla örtün.
13. 4. günde kültürler üreme açısından kontrol edilmelidir. Üreme gözlenirse vasatı alın ve her lamele 2 mL yeni önceden ısıtılmış CHANG Amnio ekleyin. Kültürler sonrasında 2 günde bir beslenmelidir. Kanlı numuneler için kültürlerin vasatının daha sık değiştirilmesi gerekebilir.
14. 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 eğitimli personelce kullanılması amaçlanmıştır.
Steril ambalajın olumsuz etkilendiği herhangi bir şişeyi kullanmayın.
CHANG Amnio ürününü etikette belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

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_2-inkubatorjih (kulture, uravnotežene v atmosferi s 5–8 % CO_2).

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

OPIS PRIPOMOČKA

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

KOMPONENTE

Pufri	Beljakovine, hormoni	Magnezijev sulfat
Natrijev bikarbonat	in rastni faktorji	Natrijev fosfat
	Serum govejega	
Antioksidant	zarodka (FBS)	Nukleinske kisline
Tioktična kislina	Serum	Deoksiadenozin
	novorojenega	Deoksicitidin
Antibiotik	teleta	Deoksigvanozin
Gentamicinijev	Humani transferin	Adenozin
sulfat	Fibroblastni rastni	Citidin
	faktor (FGF)	Gvanozin
Aminokisline	Inzulin	Timidin
Alanin	Progesteron	Uridin
Arginin	Testosteron	
Asparagin	Beta-estradiol	Drugo
Asparaginska	Hidrokortizon	Etilni alkohol
kislina		Tironin
Cistein	Indikator	
Glutaminska kislina	vrednosti pH	Vitamini in elementi
Glutamin	Fenol rdeče	v sledovih
Glicin		Askorbinska kislina
Histidin	Energijski substrati	Folna kislina
Izolevcin	Glukoza	Nikotinamid
Levcin	Piruvat	Riboflavin
Lizin	Inozitol	Tiamin
Metionin		Pantotenska kislina
Fenilalanin	Soli in ioni	Kobalamin
Prolin	Natrijev klorid	Piridoksin
Serin	Natrijev selenit	Biotin
Treonin	Kalcijev klorid	
Triptofan	Holinklorid	Voda
Tirozin	Kalijev klorid	Kakovost,
Valin	Kalijev fosfat	ki ustreza vodi
		za injekcije

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

STERILNOST

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

PRIPRAVA ZA UPORABO

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

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

ALIKVOTIRANJE MEDIJA CHANG Amnio
1. Medij CHANG Amnio odtalite po zgornjih navodilih.
2. Z aseptično tehniko ga porazdelite na alikvote primerne velikosti in ponovno zamrznite.
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 1.200 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 bolničine 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 krovna 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_2 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, da 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 1.200 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 bolničine 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_2 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, da jih lahko spravite. Če vzorci vsebujejo kri, bo morda treba pogosteje zamenjati medij za gojenje kultur.
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_2 (pokrovček naj bo nekoliko priprt).

Opomba: V mediju CHANG Amnio pogosto nastanejo kristali kalcijevega oksalata, vendar prisotnost teh kristalov ni pokazala nobenih škodljivih učinkov na uporabnost izdelka.

Priprava vzorcev horionskih vilusov:
1. Petrijevko označite za vsakega od vnesenih vzorcev, vsebino vzorcev pa prenesite na aseptični način. V posodo dodajte 5 ml vnaprej ogretega popolnega medija CHANG Amnio, nato pa jih za 30 minut namestite v inkubator pri 35–39 °C, v okolju s 5–8 % CO_2, da omogočite usedanje krvi.
2. Vzorec očistite z disekcijskim mikroskopom, najprej pod 1,5-kratno, nato pa prilagojeno pribl. 3-kratno povečavo. Opomba: Potrebnega je pribl. 20–40 mg vzorca horionskih vilusov.
3. Z dvema paroma sterilnih prijemalk odstranite krvne strdke in druge morebitne ostanke posteljice iz materala vilusov, pri tem pa delajte v posodi ob opazovanju z disekcijskim mikroskopom. Material vilusov je svetle barve, tubularen in/ali grudast z vidnimi vejami in venami.
4. Čiste viluse prenesite v drugo petrijevko, ki vsebuje vnaprej ogret popoln medij CHANG Amnio. Izvedite končno čiščenje, pri tem pa s prijemalko primite vilus in ga nežno stresite. Opomba: Za uporabo pri posameznih kulturi je idealna količina 5 mg. Pazite, da občutljivih resic ne poškodujete.
5. Viluse in medije prenesite v 15-ml epruveto za centrifugiranje, nato pa v epruveto za centrifugiranje dodajte 4 kapljice antibiotika (tj. gentamicinijevega sulfata, 50 µl/ml). Epruveto pustite pri miru 30 minut.
6. 5 minut centrifugirajte resice pri 1.400 vrt./min.

Kultura vzorca horionskih vilusov:
1. Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar pustite 0,5 ml medija nad celično usedlino (ali približno dvakratni volumen usedline).
2. Usedlino nežno ponovno suspendirajte. Dodajte 2 ml vnaprej ogretega medija CHANG Amnio v centrifugirno epruveto.
3. Dodajte 2 ml tripsin EDTA in pustite kulturo, da se 10 minut nemoteno inkubira pri temperaturi 35–39 °C v atmosferi s 5–8% CO_2. Vzemite epruveto iz inkubatorja, ponovno suspendirajte usedlino in jo postavite v inkubator za dodatnih 10 minut.
4. Vzemite centrifugirno epruveto iz inkubatorja, ponovno suspendirajte usedlino in centrifugirajte 8–10 minut pri 1.400 vrt./min.
5. Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete. Ponovno suspendirajte usedlino, nato v epruveto dodajte 1 ml kolagenaze in jo postavite v inkubator za 5 minut.
6. Epruveto vzemite iz inkubatorja in vizualno preverite, ali je usedlina motna in ali ni videti ločenih posameznih kosov resic. Če usedlina ni motna, jo ponovno postavite v inkubator za nadaljnjih 5 minut.
7. Dodajte 3 ml vnaprej ogretega medija CHANG Amnio v centrifugirno epruveto, da ustavite delovanje kolagenaze.
8. Epruveto centrifugirajte 8–10 minut pri 1.400 vrt./min.
9. Aspirirajte supernatant iz centrifugirane epruvete, vendar pustite 0,5 ml medija nad celično usedlino. Ponovno suspendirajte usedlino, preden dodate medij CHANG Amnio, ki ste ga uporabili za pripravo.
10. Pripravite optimalno število kultur z uporabo 0,5 ml medija CHANG Amnio na kulturo za vsako petrijevko, ki vključuje krovno stekelce.
11. Nato se morajo kulture nemoteno inkubirati v atmosferi s 5–8 % CO_2 pri 35–39 °C.
12. 2. dan kulture zalijte z 1,5 ml predhodno ogretega medija CHANG Amnio.
13. Po 4 dneh preverite, ali kulture rastejo. Če opazite rast, odstranite medij in na vsako krovno stekelce dodajte 2 ml predhodno ogretega svežega medija CHANG Amnio. Potem morate kulture nahraniti vsaka 2 dni. Če vzorci vsebujejo kri, bo morda treba pogosteje zamenjati medij za gojenje kultur.
14. Na 5. dan preverite, koliko so kulture zrasle, in jih spravite, ko opazite dovolj kolonij. Rezultat bo najboljši, če kulture nahranite z medijem CHANG Amnio en dan, preden jih spravite.

SHRANJEVANJE IN STABILNOST

Izdelek shranjujte zamrznjen pri temperaturi pod –10 °C. Če se shranjuje zamrznjen, je stabilen do datuma izteka uporabnosti, ki je naveden na nalepki steklenice. Neporabljen izdelek lahko razdelite na delovne alikvote in ponovno zamrznete za poznejšo uporabo ali pa dobro zaprete s pokrovčkom in do 30 dni hranite pri temperaturi 2–8 °C. Zamrzne se lahko največ dvakrat. Zaščitite pred fluorescenčno svetlobo.

PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA

Ta pripomoček sme uporabljati samo osebje, usposobljeno za postopke, ki vključujejo indicirano uporabo, za katero je pripomoček zasnovan.
Ne uporabite nobene steklenice, če je njena sterilna embalaža poškodovana.
Medija CHANG Amnio ne smete uporabljati po izteku roka uporabnosti, navedenega na nalepki.

БЪЛГАРСКИ

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

CHANG Amnio с гентамицин и L-глутамин може да се използва за следните приложения:
1. Първична култура на клетки от амниотична течност,
2. растящи пасажни клетки от амниотична течност,
3. твърда амнионна тъкан от проба на хориони въси.

Тази среда е предназначена за използване в CO_2 инкубатори (култури, еквилибрирани с 5% – 8% CO_2 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 хориони 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

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

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

СТЕРИЛНОСТ

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

ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА

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

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

АЛИКВОТИРАНЕ НА CHANG Amnio
1. Размразете CHANG Amnio съгласно 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 използват.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Използване на CHANG Amnio за първични култури: методологии *in situ*
1. Центрофугирайте амниотичната течност при приблизително 1200 rpm за 10 минути, за да концентрирате клетките.
2. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки приблизително 0,5 ml над пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата) центрофугирана амниотична течност. Разделете на аликвотни части супернатанта (поне 1 ml, ако е възможно) за анализи на алфа-фетопротеин (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесименът съдържа кръв, пригответе допълнителна аликвотна част за последващо тестване. Ресуспендирайте пелетата от клетки в малък обем амниотична течност от самия пациент. Добавете достатъчно CHANG Amnio към концентрираната суспензия на клетки, за да остане окончателен обем за нанасяне от 0,5 ml на покривно стъкло (общо 4 покривни стъкла в зависимост от размера на пелетата от клетки), или 2 ml на слайд-флакон. Ако спесименът е получен от пациента в третия триместър на бременността, пелетата може да е по-голяма, но да съдържа по-малко жизнени клетки, което ще изисква по-сериозно засаждане (по-малко среда от нормалното).
3. Инкубирайте културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO_2 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 захранват. Хранете културите, като отстранявате целия супернатант на културата и го замените с 2 ml прясна CHANG Amnio. Препоръчва се културите да се захранват 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 захранват с CHANG Amnio в деня преди събирането.

Използване на CHANG Amnio за първични култури: Методологии със слайд-флакон
1. Центрофугирайте амниотичната течност при приблизително 1200 rpm за 10 минути, за да концентрирате клетките.
2. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки приблизително 0,5 ml над пелетата от клетки (или около 2x обема на пелетата) центрофугирана амниотична течност. Разделете на аликвотни части супернатанта (поне 1 ml, ако е възможно) за анализи на алфа-фетопротеин (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесименът съдържа кръв, пригответе допълнителна аликвотна част за последващо тестване. Ресуспендирайте пелетата от клетки в малък обем амниотична течност от самия пациент. Добавете 4 ml CHANG Amnio за общ обем от 5 ml на слайд-флакон. Ако спесименът е получен от пациента в третия триместър на бременността, пелетата може да е по-голяма, но да съдържа по-малко жизнени клетки, което ще изисква по-сериозно засаждане (по-малко среда от нормалното).
3. Инкубирайте културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO_2 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 захранват 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 захранване на културите, трябва да е между 6,65 и 7,44 (т.е. средата трябва да е с леко жълтеникав розово-оранжев цвят). Нивото на pH може лесно да се регулира чрез поставяне на средата в 5% – 8% CO_2 инкубатор с леко разхлабена капачка за около 30 минути.

Забележка: Кристали калциев оксалат често се формират в CHANG Amnio. Няма данни наличието на тези кристали да причинява неблагоприятен ефект върху функционалността на продукта.

Подготовка на проба на хориони въси:
1. Обозначете с етикет петриево блюдо за всеки получен спесимен и прехвърлете асептично съдържанието на пробата. Добавете 5 ml от предварително затоплената завършена среда CHANG Amnio в блюдото и поставете в инкубатор за 30 минути при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO_2 атмосфера, за да може кръвта да се утаи.
2. Почистете спесимена с помощта на стереомикроскоп, първоначално с оптично увеличение 1,5 X пъти, след което го регулирайте до около 3 X пъти. Забележка: Необходими са приблизително 20 – 40 mg от проба на хориони въси.
3. С помощта на две стерилни пинцети отстранете кръвните съсиреци и всякакъв материал от маточна лигавица от материала от въси, докато работите в блюдото под стереомикроскопа. Материалът от въси е със светъл цвят, тръбовиден и/или на бучки, с видими разклонения и вени.
4. Прехвърлете чистите въси в друго петриево блюдо с предварително затоплена завършена среда CHANG Amnio. Извършете окончателно почистване, като използвате щипци, за да хванете въсите и леко разбъркайте. Забележка: Идеалното количество за използване е 5 mg на култура. Внимавайте да не увредите крехките въси.
5. Прехвърлете въсите и средата в центрофужна епруветка от 15 ml и добавете 4 капки антибиотик (т.е. Гентамицин сулфат, 50 µL/ml) към епруветката. Оставете да престои за 30 минути.
6. Центрофугирайте въсите при приблизително 1400 rpm за 5 минути.

Култура от проба на хориони въси:
1. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, като се уверите, че сте оставили 0,5 ml среда над пелетата от клетки (или около 2 X обема на пелетата).
2. Внимателно ресуспендирайте пелетата. Добавете 2 ml предварително затоплена среда CHANG Amnio към центрофужната епруветка.
3. Добавете 2 ml трипсин-ЕДТА и инкубирайте културата в покой при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO_2 атмосфера за 10 минути. Отстранете епруветката от инкубатора, ресуспендирайте пелетата и поставете в инкубатор за още 10 минути.
4. Отстранете центрофужната епруветка от инкубатора, ресуспендирайте пелетата и центрофугирайте за 8 – 10 минути при 1400 rpm.
5. Аспирирайте супернатанта от центрофужната епруветка. Ресуспендирайте пелетата, след това добавете 1 ml колагеназа към епруветката и поставете в инкубатор за 5 минути.
6. Отстранете от инкубатора и визуално проверете дали пелетата е мътна и не могат да се видят отделни части от отделните въси. Ако пелетата не е мътна, поставете я отново в инкубатора за още 5 минути.
7. Добавете 3 ml предварително затоплена CHANG Amnio към центрофужната епруветка, за да спрете действието на колагеназата.
8. Центрофугирайте епруветката за 8 – 10 минути при 1400 rpm.
9. Аспирирайте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки 0,5 ml среда над пелетата от клетки. Ресуспендирайте пелетата преди добавяне на CHANG Amnio, използвана за приготвяне.
10. Пригответе оптимален брой култури, като използвате 0,5 ml CHANG Amnio на култура, за всяко петриево блюдо с покривно стъкло.
11. Инкубирайте културите в покой при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO_2 атмосфера.
12. В ден 2 залейте културите, като добавите 1,5 ml предварително затоплена CHANG Amnio.
13. На 4 дни културите трябва да се проверяват за растеж. Ако се наблюдава растеж, отстранете среда и добавете 2 ml прясна, предварително затоплена CHANG Amnio към всяко покривно стъкло. Културите трябва да се хранят на всеки 2 дни след това. За спесимени с кръв културите може да изискват по-честа смяна на средата.
14. Проверете културите за растеж в ден 5 и съберете, когато се наблюдават достатъчно колонии. Най-добри резултати се постигат, когато културите се захранват с CHANG Amnio в деня преди събирането.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

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

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Това изделие е предназначено да се използва от персонал, обучен в процедурите, които включват планираното приложение, за което изделието е предназначено.
Не използвайте бутилка, чиято стерилна опаковка е нарушена.
Не използвайте CHANG Amnio след изтичане на срока на годност, посочен на етикета.

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_2 inkubatorima (kulture uravnotežene atmosferom s 5 % – 8 % CO_2).

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 začeća (POC) u svrhu kariotipizacije i drugih prenatalnih genetičkih testiranja. Optimiran je za metode u tikvici i *in situ*. Ovaj proizvod sadrži antibiotik gentamicinsulfat (50 µg/ml).

KOMPONENTE

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

OSIGURANJE KVALITETE

STERILNOST

Serum koji se koristi za proizvodnju proizvoda CHANG Amnio testiran je na kontaminaciju virusima u skladu sa Zakonikom saveznih propisa SAD-a (CFR), Glava 9., dio 113.53. Uz to, testiran je i na kontaminaciju mikoplazmom. CHANG Amnio steriliziran je filtracijom kroz filtar 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

Odmrznite na sterilnoj radnoj površini pri sobnoj temperaturi ili stavljanjem boce u vodenu kupelj pri 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 alikvote odgovarajućih veličina i ponovno zamrznuti.
3. Odmrznuti alikvote 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 pacijentičine vlastite amnijske tekućine. Dodati odgovarajuću količinu proizvoda CHANG Amnio koncentriranoj suspenziji stanica kako bi se postigao konačan volumen nasađivanja 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 nasađivanje (u manjoj količini medija nego što je uobičajeno).
3. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 – 8 % CO_2.
4. Drugi dan natopiti kulture dodavanjem 2 ml proizvoda CHANG Amnio.
5. Nakon 4 do 5 dana provjeriti rast 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 tikvici
1. Centrifugirati amnijsku tekućinu 10 minuta na otprilike 1.200 o/min kako bi se stanice koncentrirale.
2. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete tako da u njoj ostane otprilike 0,5 ml supernatanta (ili količina supernatanta oko 2x veća od volumena taloga) iznad taloga stanica centrifugirane amnijske tekućine. Ako je potrebno, alikvotirati supernatant (ako je moguće, najmanje 1 ml) za analizu alfa-fetoproteina (AFP) i acetil-kolinesteraze. Ako je uzorak krvav, pripremiti dodatni alikvot za daljnje pretrage. Obnoviti suspenziju taloga stanica u malom volumenu pacijentičine vlastite amnijske tekućine. Dodati 4 ml proizvoda CHANG Amnio kako bi se postigao ukupan volumen od 5 ml po tikvici. 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 nasađivanje (u manjoj količini medija nego što je uobičajeno).
3. Neometano inkubirati kulture pri 37 °C u atmosferi s 5 % – 8 % CO_2.
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_2 u posudi s lagano odvrnutim poklopcem na otprilike 30 minuta.

Napomena: Uobičajeno je da se u proizvodu CHANG Amnio formiraju kristali kalcijeva oksalata. Nije zabilježeno da prisutnost tih kristala ima ikakvo štetno djelovanje na performanse proizvoda.

Priprema uzorka korionskih resica:
1. Označite Petrijevu posudu za svaki primljeni uzorak, a sadržaj uzorka prenesite aseptično. U posudu dodajte 5 ml prethodno zagrijanog kompletnog medija CHANG Amnio i stavite u inkubator na 30 minuta, u atmosferu od 35 – 39 °C, 5 % – 8 % CO_2, kako bi se krv slegnula.
2. Očistite uzorak s pomoću mikroskopa za seciranje, u početku pod uvećanjem od 1,5X, a zatim prilagodbom na uvećanje od oko 3X. Napomena: Potrebno je 20 – 40 mg uzorka korionskih resica.
3. S pomoću dva para sterilnih pinceta izvadite krvne ugruške i svu deciduu majke iz materijala resica, radeći unutar posude, pod mikroskopom za seciranje. Materijal resice svijetle je boje, cjevast i/ili grozdast s vidljivim granama i venama.
4. Prenesite čiste resice u drugu Petrijevu posudu koja sadržava prethodno zagrijani kompletni medij CHANG Amnio. Izvršite završno čišćenje, upotrijebite pincetu da zahvatite resice i lagano miješate. Napomena: 5 mg idealna je količina za upotrebu u kulturi. Pazite da ne oštetite krhke resice.
5. Prenesite resice i medij u epruvetu za centrifugu od 15 ml i dodajte 4 kapi antibiotika (tj. gentamicinsulfat, 50 µl/ml) u epruvetu za centrifugu. Ostavite da odstoji 30 minuta.
6. Centrifugirati resice 5 minuta na otprilike 1.400 o/min.

Kultura uzorka korionskih resica:
1. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete, vodeći računa da u njoj ostane 0,5 ml medija iznad taloga stanica (ili količina medija oko 2X veća od volumena taloga).
2. Nježno obnoviti suspenziju taloga. Dodati 2 ml prethodno zagrijanog medija CHANG Amnio u epruvetu za centrifugu.
3. Dodati 2 ml tripsina EDTA i neometano inkubirati kulturu 10 minuta pri 35 – 39 °C u atmosferi s 5 % – 8 % CO_2. Izvaditi epruvetu iz inkubatora, obnoviti suspenziju taloga i vratiti u inkubator na dodatnih 10 minuta.
4. Izvaditi epruvetu za centrifugu iz inkubatora, obnoviti suspenziju taloga i centrifugirati 8 – 10 minuta na 1.400 o/min.
5. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete. Obnoviti suspenziju taloga, zatim dodati 1 ml kolagenaze u epruvetu i staviti u inkubator na 5 minuta.
6. 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 još 5 minuta.
7. Dodati 3 ml prethodno zagrijanog proizvoda CHANG Amnio u epruvetu za centrifugu kako bi se zaustavilo djelovanje kolagenaze.
8. Centrifugirati epruvetu 8 – 10 minuta na 1.400 o/min.
9. Aspirirati supernatant iz centrifugirane epruvete tako da u njoj ostane 0,5 ml medija iznad taloga stanica. Obnoviti suspenziju taloga prije dodavanja proizvoda CHANG Amnio koji se upotrebljava za pripremu.
10. Pripremite optimalni broj kultura s pomoću 0,5 ml CHANG Amnio po kulturi za svaku Petrijevu zdjelicu koja sadržava pokrovno stakalce.
11. Neometano inkubirati kulture pri 35 – 39 °C u atmosferi s 5 – 8 % CO_2.
12. Drugi dan natopiti kulture dodavanjem 1,5 ml prethodno zagrijanog proizvoda CHANG Amnio.
13. Nakon 4 dana provjeriti rast kultura. Ako je zabilježen rast kultura, ukloniti medij i dodati 2 ml svježeg prethodno zagrijanog 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.
14. Peti dan provjeriti rast kultura i prikupiti ih kada bude zabilježena dovoljna količina kolonija. 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 alikvote 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. Zaštititi od fluorescentnog svjetla.

MJERE OPREZA I UPOZORENJA

Predviđeno je da se ovim proizvodom koristi osoblje 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 GĦALL-UŻU

CHANG Amnio b' Gentamicin u L-Glutamine jista' jiġi użat għall-applikazzjonijiet li ġejjin:
1. il-koltura primarja ta' ċelloli tal-fluwidu amnijotiku
2. it-tkabbir ta' ċelloli sottokultivati tal-fluwidu amnijotiku
3. tessut amnijotiku solidu minn kampjuni ta' villi korjoniċi.

Dan il-midjum ġie ddisinjat għall-użu f'inkubaturi ta' CO_2 (kolturi ekwilibrati b'atmosfera ta' 5%-8% CO_2).

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-teħid 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	Magnesium sulfate
Sodium bicarbonate	u Fatturi ta' Tkabbir	Sodium phosphate
	Fetal bovine serum	
Antiossidant	(FBS)	Aċidi nuklejċi
Thioctic acid	Serum ta' bovin	Deoxyadenosine
	tat-twelid	Deoxycytidine
Antibijotiku	Transferrin uman	Deoxyguanosine
Gentamicin Sulfate	Fattur ta' tkabbir	Adenosine
	tal-fibroblast (FGF)	Cytidine
Aċidi Amminiċi	Insulina	Guanosine
Alanine	Progesterone	Thymidine
Arginine	Testosterone	Uridine
Asparagine	Beta estradiol	
Aspartic Acid	Hydrocortisone	Oħrajn
Cysteine		Ethyl alcohol
Glutamic Acid	Indikatur tal-pH	Thyronine
Glutamine	Phenol Red	
Glycine		Vitamini
Histidine	Substrati	u mikroelementi
Isoleucine	tal-Enerġija	Ascorbic acid
Leucine	Glucose	Folic acid
Lysine	Pyruvate	Nicotinamide
Methionine	Inositol	Riboflavin
Phenylalanine		Thiamine
Proline	Imluħa u Joni	Pantothenic acid
Serine	Sodium chloride	Cobalamin
Threonine	Sodium selenite	Pyridoxine
Tryptophan	Calcium chloride	Biotin
Tyrosine	Choline chloride	
Valine	Potassium chloride	Ilma
	Potassium	Kwalità tal-WFI
	phosphate	(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. Ġie skrinjat ukoll għall-kontaminazzjoni minn mikoplażma. CHANG Amnio jiġi sterilizzat permezz ta' filtrazzjoni minn ġo 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 GĦALL-UŻU

Ħoll fuq wiċċ sterili f'temperatura ambjentali jew billi tpoġġi l-flixkun f'banjumarija f'temperatura ta' 37°C.

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

IL-PREPARASSJONI TA' CHANG Amnio F'ALIKWOTI
1. Ħoll CHANG Amnio skont l-istruzzjonijiet ta' hawn fuq.
2. Qassam b'mod asettiku f'alikwoti ta' daqs konvenjenti u erġa' ffriża.
3. Ħoll l-alikwoti f'banjumarija f'temperatura ta' 37°C meta jkunu se jintużaw.

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

L-Użu ta' CHANG Amnio għal Kolturi Primarji: Metodoloġiji *in situ*
1. Iċċentrifuga l-fluwidu amnijotiku fuq madwar 1,200 rpm għal 10 minuti sabiex iċ-ċelloli jiġu kkonċentrati.
2. Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u ħalli 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 meħtieġ. Jekk il-kampjun ikun fih id-demm, 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 sabiex 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 fiha inqas ċelloli vijabbli, għalhekk tkun teħtieġ inseminazzjoni iktar qawwija (inqas midja min-normal).
3. Inkuba l-kolturi mingħajr ċaqliq f'temperatura ta' 37°C f'atmosfera ta' 5-8% CO_2.
4. Għarraq il-kolturi fit-2 jum billi żżid 2 mL ta' CHANG Amnio.
5. 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-kolturi billi tneħħi s-supernatant kollu tal-koltura u tbiddlu b'2 mL ta' CHANG Amnio frisk. Huwa rrakkomandat li mbagħad il-kolturi jiġu misqijin kull jumejn. Għall-kampjuni bid-demm, il-kolturi jistgħu jkunu jeħtieġu tibdil iktar ta' spiss tal-midja.
6. Iċċekkja kemm kibru l-kolturi fil-5 jum jew wara, u aħsad meta jiġi osservat numru suffiċjenti ta' kolonji.
7. Jinkisbu l-aħjar riżultati meta l-kolturi jiġu misqijin b'CHANG Amnio fil-jum ta' qabel il-ħsad.

L-Użu ta' CHANG Amnio għal Kolturi Primarji: Metodoloġiji fil-Flask
1. Iċċentrifuga l-fluwidu amnijotiku fuq madwar 1,200 rpm għal 10 minuti sabiex iċ-ċelloli jiġu kkonċentrati.
2. Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u ħalli 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 meħtieġ. Jekk il-kampjun ikun fih id-demm, 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 fiha inqas ċelloli vijabbli, għalhekk tkun teħtieġ inseminazzjoni iktar qawwija (inqas midja min-normal).
3. Inkuba l-kolturi mingħajr ċaqliq f'temperatura ta' 37°C f'atmosfera ta' 5%-8% CO_2.
4. Fil-5 jum iċċekkja kemm kibru. Biddel il-midjum b'2 mL CHANG Amnio frisk u aħsad jekk jiġi osservat tkabbir suffiċjenti taċ-ċelloli.
5. Iċċekkja kemm kibru l-kolturi u mbagħad biddel il-midjum kompletament kuljum sakemm jiġi osservat numru suffiċjenti ta' kolonji u jkunu lesti għall-ħsad. Għall-kampjuni bid-demm, il-kolturi jistgħu jkunu jeħtieġu tibdil iktar ta' spiss tal-midja.
6. Jinkisbu l-aħjar riżultati meta l-kolturi 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-kolturi bit-tripsina (jew pronase, eċċ) bħalma jsir normalment meta ċ-ċelloli jitkabbru f'midjum konvenzjonali. Madankollu, it-trattament bil-protease għandu jiġi mmonitorjat bir-reqqa. Ċelloli tal-fluwidu amnijotiku mkabbra fi CHANG Amnio għandhom tendenza li jkunu iktar sensittivi għat-trattament bil-protease milli meta jkunu mkabbra f'midjum konvenzjonali. Jista' jkun meħtieġ li l-protokoll tiegħek jiġi mmodifikat sabiex jittieħed 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 ftit safrani fis-salamun). Il-pH jista' jiġi aġġustat b'mod ħafif billi tpoġġi l-midjum ġo inkubatur ta' 5-8% CO_2 bit-tapp maħlul ftit għal madwar 30 minuta.

Nota: Kristalli ta' Calcium Oxalate ta' spiss jifformaw f'CHANG Amnio. Il-preżenza ta' dawn il-kristalli ma jidhirx li tikkawża xi effett detrimentali fuq il-prestazzjoni tal-prodott.

Il-Preparazzjoni ta' Kampjuni ta' Villi Korjoniċi:
1. Agħmel tikketta fuq il-Petri dixx għal kull kampjun riċevut, u ttrasferixxi l-kontenut tal-kampjun b'mod asettiku. Żid 5 mL tal-midja kompluta CHANG Amnio msaħħna minn qabel fid-dixx, u qiegħed f'inkubatur għal 30 minuta, f'temperatura ta' 35 - 39°C, f'atmosfera ta' 5 - 8% CO_2, biex tħalli d-demm joqgħod.
2. Naddaf il-kampjun bl-użu ta' sterjomikroskopju, inizjalment bi tkabbir ta' 1.5X, imbagħad b'aġġustament għal tkabbir ta' madwar 3X. Nota: Huwa meħtieġ madwar 20 - 40 mg ta' kampjun ta' villi korjoniċi.
3. Bl-użu ta' żewġ pari ta' forbiċi sterili, neħħi l-emboli tad-demm u kwalunkwe deċiduwa matern mill-materjal tal-villus, waqt li taħdem fid-dixx, taħt l-isterjomikroskopju. Il-materjal tal-villus huwa ta' kulur ċar, tubulari u/jew bil-boċċi b'fergħat u vini viżibbli.
4. Ittrasferixxi l-villi nodfa għal Petri dixx ieħor li jkun fih il-midja kompluta CHANG Amnio msaħħna minn qabel. Wettaq tindif finali, billi tuża forbiċi biex taqbad il-villi u tħawwad bil-mod. Nota: 5 mg huwa l-ammont ideali li għandu jintuża għal kull koltura. Oqgħod attent li ma ssirx ħsara lill-villi fraġli.
5. Ittrasferixxi l-villi u l-midja għal tubu ċentrifugu ta' 15 mL, u żid 4 qatriet ta' antibijotiku (jiġifieri Gentamicin Sulfate, 50 µL/mL) fit-tubu ċentrifugu. Ħalli joqgħod għal 30 minuta.
6. Iċċentrifuga l-villi fuq madwar 1,400 rpm għal 5 minuti.

Koltura ta' Kampjun ta' Villi Korjoniċi:
1. Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u kun żgur li tħalli 0.5 mL tal-midja fuq il-gerbuba taċ-ċelloli (jew madwar 2X il-volum tal-gerbuba).
2. Erġa' ssospendi l-gerbuba bil-mod. Żid 2 mL ta' midja CHANG Amnio msaħħna minn qabel fit-tubu ċentrifugu.
3. Żid 2 mL Trypsin EDTA u inkuba l-koltura mingħajr ċaqliq f'temperatura ta' 35 - 39°C, f'atmosfera ta' 5 - 8% CO_2 għal 10 minuti. Neħħi t-tubu mill-inkubatur, erġa' ssospendi l-gerbuba u poġġi fl-inkubatur għal 10 minuti oħra.
4. Neħħi t-tubu ċentrifugu mill-inkubatur, erġa' ssospendi l-gerbuba u ċċentrifuga għal 8-10 minuti fuq 1,400 rpm.
5. Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat. Erġa' ssospendi l-gerbuba, imbagħad żid 1 mL ta' collagenase u poġġi fl-inkubatur għal 5 minuti.
6. Neħħi mill-inkubatur u viżwalment iċċekkja biex tara jekk il-gerbuba tidhirx imdardra u li ma jidhrux biċċiet distinti ta' villi individwali. Jekk il-gerbuba ma tidhirx imdardra, erġa' poġġi fl-inkubatur għal 5 minuti oħra.
7. Żid 3 mL CHANG Amnio msaħħna minn qabel fit-tubu ċentrifugu sabiex titwaqqaf l-azzjoni tal-collagenase.
8. Iċċentrifuga t-tubu għal 8 - 10 minuti fuq 1,400 rpm.
9. Aspira s-supernatant mit-tubu ċċentrifugat, u ħalli madwar 0.5 mL tal-midja fuq il-gerbuba taċ-ċelloli. Erġa' ssospendi l-gerbuba qabel ma żżid iċ-CHANG Amnio li ntuża għall-preparazzjoni.
10. Ipprepara n-numru ottimu ta' kolturi bl-użu ta' 0.5 mL ta' CHANG Amnio għal kull koltura għal kull petri dixx li fih kopertina.
11. Inkuba l-kolturi mingħajr ċaqliq f'temperatura ta' 35 - 39°C f'atmosfera ta' 5 - 8% CO_2.
12. Għarraq il-kolturi fit-tieni (2) jum billi żżid 1.5 mL CHANG Amnio msaħħna minn qabel.
13. Wara 4 ijiem, għandu jiġi ċċekkjat kemm kibru l-kolturi. Jekk jiġi osservat li kibru, neħħi l-midja u żid 2 mL CHANG Amnio frisk imsaħħna minn qabel lil kull coverslip. Il-kolturi mbagħad għandhom jiġu misqijin kull jumejn. Għall-kampjuni bid-demm, il-kolturi jistgħu jkunu jeħtieġu tibdil iktar ta' spiss tal-midja.
14. Iċċekkja kemm kibru l-kolturi fil-5 jum u aħsad meta jiġi osservat numru suffiċjenti ta' kolonji. Jinkisbu l-aħjar riżultati meta l-kolturi jiġu misqijin b'CHANG Amnio fil-jum ta' qabel il-ħsad.

ĦAŻNA U STABBILTÀ

Aħżen iffriżat f'temperatura ta' -10°C. Il-prodott huwa stabbli sad-data ta' skadenza li tidher fuq it-tikketta tal-flixkun meta maħżun iffriżat. Jekk jibqa' xi ammont ta' prodott li ma ntużax jista' jiġi ddispensat f'alikwoti utilizzabbli u ffriżat mill-ġdid 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 ffriżat sa massimu ta' darbtejn. Ipproteġi minn dawl fluworexxenti.

PREKAWZJONIJIET U TWISSIJIET

Dan l-apparat huwa maħsub għall-użu minn persunal imħarreġ 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.

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_2 (kultúrach ustálených s atmosférou 5 % – 8 % CO_2).

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 produktoch na počatie (POC) na použitie pri karyotypovaní a iných prenatálnych genetických testoch. Je optimalizovaný pre metodiky fľašiek aj in situ. Tento produkt obsahuje antibiotikum gentamicínsulfát (50 µg/ml).

ZLOŽKY

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

KONTROLA KVALITY

STERILITA

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

PRÍPRAVA NA POUŽITIE

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

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

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 su 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 bunkovou peletou (alebo 2x objem pelety) odstredenej plodovej vody. Podľa potreby alikvotujte supernatant (najmenej 1 ml, ak je to možné), na analýzu alfafetoproteínu (AFP) a acetylcholínesterázy. 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_2.
4. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 2 ml CHANG Amnio.
5. Po 4 až 5 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Kultúry treba priživiť, keď sa spozoruje rast. Kultúry priživte odstránením všetkého supernatantu kultúry a pridaním 2 ml čerstvého CHANG Amnio. Potom sa odporúča kultúry priživiť každé 2 dni. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
6. Rast na kultúrach skontrolujte okolo 5. dňa a vykonajte zber, keď spozorujete dostatočné kolónie.
7. Najlepšie výsledky sa dosiahnu, keď sú kultúry priživené 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 bunkovou peletou (alebo 2x objem pelety) odstredenej plodovej vody. Podľa potreby alikvotujte supernatant (najmenej 1 ml, ak je to možné), na analýzu alfafetoproteínu (AFP) a acetylcholínesterázy. 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_2.
4. Skontrolujte rast na 5. deň. Ak pozorujete dostatočný rast buniek, vymeňte médium za 2 ml čerstvého CHANG Amnio a vykonajte zber.
5. Skontrolujte rast na kultúrach a potom kompletne vymieňajte médium každý deň dovtedy, kým nepozorujete dostatočné kolónie a nie sú pripravené na zber. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
6. Najlepšie výsledky sa dosiahnu, keď sú kultúry priživené CHANG Amnio deň pred zberom.

Použitie CHANG Amnio na rast pasážovaných buniek plodovej vody:

Na pasážovanie buniek ošetrite kultúry trypsínom (alebo pronázou atď.) ako obvykle, keď sa bunky pestujú v konvenčnom médiu. Ošetrenie pronázou však treba pozorne sledovať. Bunky plodovej vody vypestované v CHANG Amnio sú zvyčajne citlivejšie na ošetrenie 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 žlto-lososovú farbu). pH možno jednoducho upraviť vložením média do inkubátora s 5 % – 8 % CO_2 s mierne uvoľneným vrchnákom na asi 30 minút.

Poznámka: V CHANG Amnio sa bežne tvoria kryštály oxalátu vápenatého. Nepreukázalo sa, že by prítomnosť týchto kryštálov mala dopad na výkon tohto produktu.

Príprava vzorky z choriových klkov:
1. Označte Petriho misku pre každú prijatú vzorku a obsah vzorky asepticky preneste. 5 ml zahriateho kompletného média CHANG Amnio dajte do misky a vložte do inkubátora na 30 minút pri teplote 35 °C – 39 °C, v atmosfére 5 – 8 % CO_2, aby sa krv mohla usadiť.
2. Vzorku očistite pomocou disekčného mikroskopu, najprv pod zväčšením 1,5 x, potom zväčšenie upravte na 3 x. Poznámka: Potrebná je vzorka s približne 20 – 40 choriových klkov.
3. Pomocou dvoch párov sterilných kliešťí odstráňte z klkového materiálu krvné zraženiny a všetku materskú deciduu, kým pracujete v miske, pod disekčným mikroskopom. Klkový materiál je svetlej farby, valcovitý a/alebo hrčovitý s viditeľnými vetvami a žilami.
4. Čisté krky preneste do ďalšej Petriho misky obsahujúcej zahriate kompletné médium CHANG Amnio. Vykonajte záverečné čistenie, kliešťami uchopte klky a jemne nimi hýbte. Poznámka: Ideálne množstvo na použitie na jednu kultúru je 5 mg. Dajte pozor, aby ste nepoškodili krehké klky.
5. Preneste klky a médium do 15 ml skúmavky na odstreďovanie a pridajte 4 kvapky antibiotika (t. j. gentamicínsulfát, 50 µl/ml) do skúmavky na odstreďovanie. Nechajte postáť 30 minút.
6. Klky odstreďujte pri 1 400 otáčok za minútu 5 minút.

Kultivácia vzorky z choriových klkov:
1. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovou peletou (alebo 2X objem pelety).
2. Peletu jemne resuspendujte. Do skúmavky na odstreďovanie pridajte 2 ml zahriateho média CHANG Amnio.
3. Pridajte 2 ml trypsínu EDTA a nerušené kultúry inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO_2 10 minút. Skúmavku vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a vložte ju do inkubátora na ďalších 10 minút.
4. Skúmavku na odstreďovanie vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a odstreďte ju 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
5. Z odstredenej skúmavky aspirujte supernanat. Peletu resuspendujte, potom do skúmavky pridajte 1 ml kolagenázy a vložte ju do inkubátora na 5 minút.
6. Vyberte z inkubátora a zrakom skontrolujte, či peleta nie je zakalená a či nie je vidieť zjavné kusy jednotlivých klkov. Ak peleta nie je zakalená, vložte ju naspäť do inkubátora na ešte 5 minút.
7. Pridajte 3 ml zahriateho roztoku CHANG Amnio do skúmavky na odstreďovanie, aby sa zastavilo pôsobenie kolagenázy.
8. Skúmavku odstreďujte 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
9. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovou peletou. Peletu resuspendujte skôr, než pridáte CHANG Amnio použité na prípravu.
10. Pripravte optimálny počet kultúr s použitím 0,5 ml CHANG Amnio na jednu kultúru na každú Petriho misku, ktorá obsahuje krycie sklíčko.
11. Nerušené kultúry inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO_2.
12. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 1,5 ml zahriateho roztoku CHANG Amnio.
13. Po 4 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Ak pozorujete rast, odstráňte médium a pridajte 2 ml čerstvého zahriateho roztoku CHANG Amnio na každé krycie sklíčko. Potom sa majú kultúry priživiť každé 2 dni. Pri krvavých vzorkách si kultúry môžu vyžadovať častejšie výmeny média.
14. Rast na kultúrach skontrolujte okolo 5. dňa a vykonajte zber, keď spozorujete dostatočné kolónie. Najlepšie výsledky sa dosiahnu, keď sú kultúry priživené CHANG Amnio deň pred zberom.

UCHOVÁVANIE A STABILITA

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