



CHANG Amnio with Gentamicin and L-Glutamine

Catalog No. 99473

100 mL, 500 mL

For *in vitro* diagnostic use.Zur *In-vitro*-Diagnostik.Solo per uso diagnostico *in vitro*.Para uso diagnóstico *in vitro*.Pour diagnostics *in vitro*.Para utilização em diagnóstico *in vitro*.Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.Pro diagnostické použití *in vitro*.Til *in vitro*-diagnostik.*In vitro* -diagnostikkaan.Lietošanai *in vitro* diagnostikā.Uitsluitend voor *in vitro* diagnostisch gebruik.Do diagnostyki *in vitro*.Pentru uz diagnostic *in vitro*.For *in vitro*-diagnostik.*In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks.*In vitro* diagnostikakai alkalmazáshoz.Skirta *in vitro* diagnostikai.*In vitro* diagnostik kullanim için.Na diagnostické použitie *in vitro*.За *in vitro* диагностична употреба.За употребу *in vitro* dijagnostiki.Ghal užu dijanjostiku *in vitro*.Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Glossary of Symbols*:



Catalog Number



Lot Number



Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)

Expiration:
Year - Month - Day

Caution, consult accompanying documents



Consult instructions for use



-10°C

Storage Temperature
store below -10°C

Do Not Re-Sterilize



Do not use if package is damaged



Manufacturer



CE Mark

Emergo Europe - Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands*Symbol Reference - **EN ISO 15223-1**, Medical devices –
Symbols to be used with medical device labels, labeling.

INDICATION FOR USE

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 CO₂ incubators (cultures equilibrated with 5%-8% CO₂ atmosphere).

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

DEVICE DESCRIPTION

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

COMPONENTS

<u>Buffers</u> Sodium bicarbonate	<u>Proteins, Hormones, and Growth Factors</u> Fetal bovine serum (FBS) Newborn bovine serum Human transferrin Fibroblast growth factor (FGF) Insulin Progesterone Testosterone Beta estradiol Hydrocortisone	Magnesium sulfate Sodium phosphate
--------------------------------------	---	---------------------------------------

<u>Antioxidant</u> Thioctic acid	<u>Nucleic acids</u> Deoxyadenosine Deoxycytidine Deoxyguanosine Adenosine Cytidine Guanosine Thymidine Uridine
-------------------------------------	---

<u>Antibiotic</u> Gentamicin Sulfate	<u>Other</u> Ethyl alcohol Thyronine
---	--

<u>Amino Acid</u> Alanine Arginine Asparagine Aspartic Acid Cysteine Glutamic Acid Glutamine Glycine Histidine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalanine Proline Serine Threonine Tryptophan Tyrosine Valine	<u>pH Indicator</u> Phenol red
---	-----------------------------------

<u>Energy Substrates</u> Glucose Pyruvate Inositol	<u>Vitamins and trace elements</u> Ascorbic acid Folic acid Nicotinamide Riboflavin Thiamine Pantothenic acid Cobalamin Pyridoxine Biotin
---	--

<u>Salts & Ions</u> Sodium chloride Sodium selenite Calcium chloride Choline chloride Potassium chloride Potassium phosphate	<u>Water</u> WFI Quality
--	-----------------------------

QUALITY ASSURANCE

STERILITY

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

PREPARATION FOR USE

Thaw 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% CO₂ 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% CO₂ 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% CO₂ 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, place in place in an incubator for 30 minutes, at 35 - 39°C, 5 - 8% CO₂ 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% CO₂ 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% CO₂ atmosphere.
12. Flood cultures on day 2 by adding 1.5 mL of prewarmed CHANG Amnio.
13. At 4 days, cultures should be checked for growth. If growth is observed, remove media and add 2 mL of fresh prewarmed CHANG Amnio to each coverslip. Cultures should be fed every 2 days thereafter. For bloody specimens, cultures may require more frequent media changes.
14. Check cultures for growth on day 5, and harvest when sufficient colonies are observed. Best results obtained when cultures are fed with CHANG Amnio the day before the harvest.

STORAGE AND STABILITY

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

PRECAUTIONS AND WARNINGS

This device is intended to be used by staff trained in procedures that include the indicated application for which the device is intended. Do not use any bottle in which the sterile packaging has been compromised. Do not use CHANG Amnio beyond the expiration date indicated on the label.

DEUTSCH

INDIKATIONEN

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

- Primärkultur von Fruchtwasserzellen
- Wachsende passagierte Fruchtwasserzellen
- Festes Amniongewebe aus einer Chorionzottenbiopsie

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

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

PRODUKTBESCHREIBUNG

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

INHALTSSTOFFE

Puffer	Proteine_Hormone und Wachstums-faktoren	Magnesiumsulfat <p>Natriumphosphat</p>
Natriumbicarbonat	Fetales Kalberserum (FBS)	Desoxyadenosin <p>Desoxycytidin <p>Desoxyguanosin</p></p>
Antioxidans	Nukleinsäuren	Adenosin <p>Cytidin</p>
Thioctansäure	Humanes	Guanosin
Antibiotikum	Transferrin	Fibrolactam- wachstumsfaktor
Gentamicinsulfat	Insulin	Thymidin
Aminosäure	Progesteron	Uridin
Alanin	Testosteron	Andere
Arginin	Ethylalkohol	Ethylalkohol
Asparagin	Thyronin	Thyronin
Asparaginsäure	Vitamine und Spurenelemente	Vitamine und Spurenelemente
Cystein	Ascorbinsäure	Ascorbinsäure
Glutaminsäure	Folsäure	Folsäure
Glutamin	Nikotinamid	Nikotinamid
Glycin	Riboflavin	Riboflavin
Histidin	Thiamin	Thiamin
Isoleucin	Pantothensäure	Pantothensäure
Leucin	Cobalamin	Cobalamin
Lysin	Pyridoxin	Pyridoxin
Methionin	Inositol	Inositol
Phenylalanin	Salze und Ionen	Salze und Ionen
Prolin	Natriumchlorid	Natriumchlorid
Serin	Natriumselenit	Natriumselenit
Theonin	Calciumchlorid	Calciumchlorid
Tryptophan	Cholinchlorid	Cholinchlorid
Tyrosin	Kaliumchlorid	Kaliumchlorid
Valin	Kaliumphosphat	Kaliumphosphat

QUALITÄTSSICHERUNG

STERILITÄT

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

VORBEREITUNG

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

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

ALIUQUOTIEREN DES CHANG Amnio

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

GEBAUCHSANWEISUNG

Verwendung von CHANG Amnio für Primärkulturen:

In-situ-Methoden

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

- Die Kulturen ungestört bei 37 °C in einer 5–8%igen CO₂-Atmosphäre inkubieren.
- Die Kulturen an Tag 2 überspülen, indem 2 ml CHANG Amnio zugegeben werden.
- Nach 4 bis 5 Tagen sollten die Kulturen auf Wachstum überprüft werden. Die Kulturen sollen genährt werden, sobald ein Wachstum festgestellt wurde. Die Kulturen nähren, indem Kulturüberstand entfernt wird und stattdessen 2 ml frisches CHANG Amnio zugegeben werden. Es wird empfohlen, dass Kulturen danach alle 2 Tage genährt werden. Bei Proben mit hohem Blutgehalt können Kulturen häufigere Medienwechsel erfordern.
- An/oder nach Tag 5 die Kulturen auf Wachstum prüfen und entnehmen, wenn ausreichend Kolonien vorhanden sind.
- Die besten Ergebnisse werden erreicht, wenn die Kulturen am Tag vor der Entnahme mit CHANG Amnio genährt werden.

Verwendung von CHANG Amnio für Primärkulturen: Flaschen-Methoden

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

Verwendung von CHANG Amnio für wachsende passagierte Fruchtwasserzellen:

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

Hinweis: Häufig bilden sich Calciumoxalatkristalle im CHANG Amnio. Es gibt keine Hinweise, dass die Anwesenheit dieser Kristalle die Produktleistung beeinträchtigt.

Chorionzotten-Probenvorbereitung:

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

Chorionzotten-Probenkultur:

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

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

LAGERUNG UND STABILITÄT

Tiefgekühlt unter -10 °C lagern. Bei Tiefkühlagerung ist das Produkt bis zu dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Unbenutzte Produkte können in Arbeitsaliquote abgefüllt und zur späteren Verwendung wieder eingefroren oder fest verschlossen und bei 2 °C bis 8 °C bis zu 30 Tage gelagert werden. Sie können maximal zweimal aufgetaut werden. Keinem Fluoreszenzlicht aussetzen.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Das Produkt ist für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in Verfahren geschult ist, die den für das Produkt vorgesehenen Anwendungsbereich umfassen. Keine Flaschen verwenden, deren Sterilverpackung beschädigt wurde.

CHANG Amnio nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

ITALIANO

INDICAZIONI PER L'USO

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

- culture primarie di cellule di liquido amniotico;
- culture secondarie di cellule di liquido amniotico;
- tessuto amniotico solido da prelievo dei villi coriali.

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

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

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

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

Tamponi	Proteine_ormoni e fattori di crescita	Acidi nucleici
Bicarbonato di sodio	Siero bovino fetale neonatale	Deossiadenosina <p>Deossicitidina <p>Deossiguanosina</p></p>
Antiossidante	Transferrina umana	Citidina
Acido tiotico	Fattore di crescita del fibroblasti	Guanosina <p>Timidina <p>Uridina</p></p>
Antibiotico	Insulina	Altro
Gentamicina solfato	Progesterone	Alcol etilico
	Testosterone	Tironina
	Beta estradiolo	
	Idrocortisone	
Aminocacidi	Acido aspartico	Vitamine ed elementi in tracce
Alanina	Cisteina	Acido ascorbico
Arginina	Acido glutammico	Acido folico
Asparagina	Glutamina	Nicotinamide
Acido aspartico	Glicina	Riboflavina
Cisteina	Istidina	Tiamina
Acido glutammico	Isoleucina	Acido pantotenico
Glutamina	Leucina	Cobalamina
Glicina	Lisina	Piridossina
Istidina	Metionina	Biotina
Isoleucina	Fenilalanina	Acqua
Leucina	Prolina	Qualità WFI (acqua per iniezioni)
Lisina	Serina	
Metionina	Treonina	
Fenilalanina	Triptofano	
Prolina	Tirosina	
Serina	Valina	
Treonina		
Triptofano		
Tirosina		
Valina		

GARANZIA DI QUALITÀ

STERILITÀ

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

PREPARAZIONE PER L'USO

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

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

SUDDIVISIONE DI CHANG Amnio IN ALIQUOTE

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

ISTRUZIONI PER L'USO

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

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

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

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

Uso di CHANG Amnio per colture primarie: metodologie in fiasca

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

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

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

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

Nota – La formazione di cristalli di ossalato di calcio in CHANG Amnio è un fenomeno normale. La presenza di questi cristalli non ha evidenziato effetti negativi sulle prestazioni del prodotto.

Preparazione di un campione di villi coriali

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

in un incubatore per 30 minuti, a 35-39 °C in un'atmosfera al 5-8% di CO₂, per consentire al sangue di depositarsi sul fondo.

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

Coltura di un campione di villi coriali

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

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare congelato a temperatura inferiore a -10 °C. Se conservato congelato, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone. Il prodotto non utilizzato può essere dispensato in aliquote idonee all'utilizzo e ricongelato per utilizzarlo successivamente, oppure chiuso bene e conservato a 2-8 °C fino a 30 giorni; ricongelare non oltre due volte. Proteggere da luce fluorescente.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di personale addestrato nelle procedure che comprendono l'applicazione prevista del prodotto stesso. Non usare flaconi la cui confezione sterile sia stata compromessa. Non utilizzare CHANG Amnio dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

ESPAÑOL

INDICACIÓN DE USO

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

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

COMPONENTES

Sistemas tampón Bicarbonato sodico	Proteínas, hormonas y factores de crecimiento Fosfato potásico Sulfato magnésico Fosfato sodico
Antioxidante Ácido itlico	Acidos nucleicos Suero bovino fetal (FBS) Suero bovino neonatal Transferrina humana Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
Antibiótico Sulfato de gentamicina	Desoxidenosina Desoxicilidina Desoxyguanosina Adenosina Citidina Guanosina Timidina Uridina
Aminoácidos Alanina Arginina Asparagina Ácido aspártico Cisteína Ácido glutámico Glutamina Glicina Histidina Isoleucina Leucina Lisina Metionina Fenilalanina Prolina Serina Treonina Triptófano Tirosina Valina	Otros Alcohol etílico Tironina
	Indicador del pH Rojo de fenol
	Vitaminas y oligoelementos Ácido ascórbico Ácido fólico Nicotinamida Glucosa Tiamina
	Sustratos energéticos Riboflavina Piruvato Inositol
	Sales e iones Cloruro sodico Selenito sodico Cloruro cálcico Cloruro de calcio Cloruro potásico
	Vitamins Ácido ascórbico Nicotinamida Tiamina Piridoxina Biotina
	Aqua Calidad de agua para inyectables

GARANTÍA DE CALIDAD

ESTERILIDAD

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

PREPARACIÓN PARA EL USO

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

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

DIVISIÓN EN ALÍCUOTAS EL CHANG Amnio

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

INSTRUCCIONES DE USO

Uso del CHANG Amnio para cultivos primarios:

métodos *in situ*

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

Uso del CHANG Amnio para cultivos primarios: Métodos de frasco

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

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

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

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

Nota: En el CHANG Amnio se forman con frecuencia cristales de oxalato cálcico. No se ha demostrado que la presencia de estos cristales merme el rendimiento del producto.

Preparación de la muestra de vellosidades coriónicas:

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

Cultivo de la muestra de vellosidades coriónicas:

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

FRANÇAIS

INDICATION D'UTILISATION

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

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

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

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

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

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

COMPOSANTS

Tampons Bicarbonate de sodium	Protéines, hormones et facteurs de croissance Phosphate de potassium Sulfate de magnésium Phosphate de sodium
Antioxydant Acide thiocitric	Acides nucléiques Sérum de veau foetal (SVF) Sérum de veau naissant
Antibiotique Sulfate de gentamicine	Desoxydénosine Desoxycytidine Desoxyguanosine Adénosine Cytidine Guanosine Thymidine Uridine
Acides aminés Alanine Arginine Asparagine Acide aspartique Cystéine Acide glutamique Glutamine Glycine Histidine Isoleucine Leucine Lysine Méthionine Phénylalanine Proline Sérine Thréonine Tryptophane Tyrosine Valine	Autre Alcool éthylique Thyronine
	Indicateur de pH Rouge de phénol
	Substrats énergétiques Glucose Pyruvate Inositol
	Sels et ions Chlorure de sodium Sélénite de sodium Chlorure de calcium Chlorure de choline Chlorure de potassium
	Eau Qualité WFI

ASSURANCE QUALITÉ

STÉRILITÉ

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

PRÉPARATION

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

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

PRÉPARATION D'ALIQUOTES DE CHANG Amnio

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

MODE D'EMPLOI

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

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

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

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

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

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

Pour repiquer les cellules, traiter les cultures avec de la tryp sine (ou de la pronase, etc.) comme vous le faites normalement lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu conventionnel. Le traitement avec des protéases doit cependant être surveillé avec prudence. Les cellules du liquide amniotique cultivées dans du CHANG Amnio ont tendance à être plus sensibles au traitement protéasique que celles cultivées dans un milieu traditionnel. Il peut être nécessaire de modifier le protocole en conséquence. Remarque : le pH du milieu utilisé pour alimenter les cultures doit se situer entre 6,65 et 7,44 (c.-à-d. le milieu doit être de couleur légèrement saumon-jaunâtre). Le pH peut facilement être ajusté en plaçant le milieu dans un incubateur contenant entre 5 et 8 % de CO₂ avec le bouchon légèrement desserré pendant environ 30 minutes. Remarque : des cristaux d'oxalate de calcium se forment en général dans CHANG Amnio. Il n'a pas été démontré que la présence de ces cristaux compromet les performances du produit.

Préparation des échantillons de villosités choriales :

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

Culture des échantillons de villosités choriales :

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

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

CONSERVATION ET STABILITÉ

Le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'il est conservé congelé en dessous de -10 °C. Tout produit non entamé peut être réparé dans des aliquotes de travail et recongelé pour une utilisation ultérieure, ou son flacon fermé hermétiquement et conservé entre 2 et 8 °C pendant 30 jours maximum. Il peut être congelé deux fois maximum. Protéger de la lumière fluorescente.

PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Ce dispositif est destiné à une utilisation par un personnel formé aux techniques comprenant l'application indiquée pour laquelle le dispositif est prévu.

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

Ne pas utiliser CHANG Amnio au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

PORTUGUÊS

INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO

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

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

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

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

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

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

COMPONENTES

Tampões Bicarbonato de sódio	Proteínas, hormonas e fatores de crescimento Soro bovino fetal (FBS) Soro bovino neonatal Transferrina humana Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) Insulina Progesterona Testosterona Beta-estradiol Hidrocorisona	Sulfato de magnésio Fostato de sódio
Antioxidante Ácido tiótico	Ácidos nucleicos Desoxiadenosina Desoxicitidina Desoxiguanosina	
Antibiótico Sulfato de gentamicina	Adenosina Citidina Guanosina Timidina Uridina	
Aminoácido Alanina Arginina Asparagina Ácido aspártico Cisteína Ácido glutâmico Glutamina Glicina Histidina Isoleucina Leucina Lisina Metionina Fenilalanina Prolina Serina Treonina Triptofano Tirosina Valina	Outro Alcool etílico Tironina	
	Vitaminas e oligoelementos Ácido ascórbico Ácido fólico Nicotinamida Riboflavina Tiamina Ácido pantoténico Cobalamina Piridoxina Biotina	
	Água Qualidade WFI (água p/ preparações injetáveis)	

GARANTIA DE QUALIDADE

ESTERILIDADE

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

PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO

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

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

DIVIDIR EM ALÍQUOTAS O CHANG Amnio

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

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

Nota: A formação de cristais de oxalato de cálcio é frequente no CHANG Amnio. A presença destes cristais não demonstrou causar qualquer efeito prejudicial no desempenho do produto.

Preparação de amostra das vilosidades coriônicas:

1. Identifique uma placa de Petri para cada espécime recebido e transfira asseticamente o conteúdo da amostra. Adicione 5 ml do meio completo CHANG Amnio pré-aquecido à placa e coloque numa incubadora durante 30 minutos, a 35 °C–39 °C, numa atmosfera de 5%–8% CO₂, para permitir que o sangue assente.
2. Limpe o espécime com um microscópio de dissecação, inicialmente com uma ampliação de 1,5X e ajustando posteriormente para uma ampliação de aproximadamente 3X. Nota: É necessária uma amostra de vilosidades coriônicas de aprox. 20–40 mg.
3. Utilizando dois pares de pinças estéreis, retire os coágulos sanguíneos e qualquer decúdua materna do material das vilosidades enquanto trabalha na placa sob visualização com o microscópio de dissecação. O material das vilosidades apresenta uma cor clara, um padrão tubular e/ou aglomerados com ramificações e veias visíveis.

4. Transfira as vilosidades limpas para outra placa de Petri contendo o meio completo CHANG Amnio pré-aquecido. Efetue a limpeza final, utilizando uma pinça para segurar as vilosidades e agitá-las suavemente. Nota: 5 mg é a quantidade ideal a utilizar por cultura. Tenha cuidado para evitar danificar as vilosidades frágeis.
5. Transfira as vilosidades e os meios para um tubo de centrifugadora de 15 ml, e adicione 4 gotas de antibiótico (ou seja, sulfato de gentamicina, 50 µg/ml) ao tubo de centrifugadora. Deixe repousar durante 30 minutos.
6. Centrifugue as vilosidades a, aproximadamente, 1400 rpm durante 5 minutos.

Cultura de amostra das vilosidades coriônicas:

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

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

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Conserve congelado a uma temperatura inferior a -10 °C. O produto é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo do frasco, desde que conservado congelado. O produto não usado pode ser dispensado em alíquotas de trabalho e recongelado para utilização posterior ou bem tapado e conservado entre 2 °C e 8 °C durante um período de até 30 dias; pode ser congelado 2 vezes no máximo. Proteger da luz fluorescente.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

Este dispositivo destina-se a ser utilizado por pessoal com formação em técnicas que incluem a aplicação indicada à qual se destina o dispositivo.

Não utilize nenhum frasco cuja embalagem estéril tenha sido comprometida.

Não utilize o CHANG Amnio para além do prazo de validade indicado no rótulo.

DANSK

INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

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

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

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

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

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

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

KOMPONENTER

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

KVALITETSSIKRING

STERILITET

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

KLARGØRING

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

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

AFMÅLING AF CHANG Amnio

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

BRUGSANVISNING

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

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

Anvendelse af CHANG Amnio til primære kulturer: Metodologi med kolbe

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

Anvendelse af CHANG Amnio til dyrkning af passerende amnionvæskeceller:

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

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

Bemærk: Der dannes ofte kalciomoxalatkrystaller i CHANG Amnio. Tilstedeværelsen af disse krystaller leder ikke til at forårsage nogen skadelig effekt på produktets ydeevne.

Forberedelse af chorionvilli-prøver:

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

Chorionvilli-prøvekultur:

1. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør, og sørg for at efterlade 0,5 ml medium over cellepelleten (eller ca. 2x pelletvolumen).
2. Resuspender pelleten forsigtigt. Tilsæt 2 ml forvarmet CHANG Amnio-medium til centrifugerøret.
3. Tilsæt 2 ml trypsin-EDTA, og inkuber kulturen uforstyrret ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂ i 10 minutter. Tag røret ud af inkubatoren, resuspender pelleten, og anbring den i inkubator i yderligere 10 minutter.
4. Tag centrifugerøret ud af inkubatoren, resuspender pelleten, og centrifuger i 8-10 minutter ved 1.400 o/min.
5. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør. Resuspender pelleten, tilsæt derefter 1 ml kollagenase til røret, og anbring det i inkubator i 15 minutter.
6. Tag røret ud af inkubatoren, og se efter, om pelleten er uklar, og at der ikke kan ses enkelte stykker villi. Hvis pelleten ikke er uklar, sættes den tilbage i inkubatoren i 5 minutter mere.
7. Tilsæt 3 ml forvarmet CHANG Amnio til centrifugerøret for at stoppe aktivitet af kollagenase.
8. Centrifuger røret i 8-10 minutter ved 1.400 o/min.
9. Aspirer supernatanten fra det centrifugerede rør, og efterlad 0,5 ml medium over cellepelleten. Resuspender pelleten for tilsætning af CHANG Amnio, der skal bruges til opsætning.
10. Sæt det optimale antal kulturer op med 0,5 ml CHANG Amnio pr. kultur i hver petriskål, der indeholder et dækglas.
11. Inkuber kulturerne uforstyrret ved 35-39 °C i en atmosfære med 5-8 % CO₂.
12. Skyl kulturerne på dag 2 ved at tilsætte 1,5 ml forvarmet CHANG Amnio.
13. Efter 4 dage skal kulturerens vækst kontrolleres. Hvis der observeres vækst, fjernes mediet, og der tilsættes 2 ml frisk forvarmet CHANG Amnio til hvert dækglas. Kulturerne skal næres hver anden dag herefter. I forbindelse med blodige prøver kan kulturerne kræve hyppigere medieskift.
14. Kontroller kulturerens vækst på dag 5, og høst, når der observeres nok kolonier. De bedste resultater opnås, hvis kulturerne forsynes med CHANG Amnio dagen inden høsten.

OPBEVARING OG STABILITET

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

FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

Dette udstyr er beregnet til brug af personale, der er uddannet i procedurer, der inkluderer den indicerede anvendelse, som dette udstyr er beregnet til. Flasker, hvis sterile emballage er blevet kompromiteret må ikke anvendes.

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

NEDERLANDS

INDICATIE VOOR GEBRUIK

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

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

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

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

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

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

COMPONENTEN

Buffers	Eiwitten hormonen en groeifactoren	Nucleinezuren
Natriumbicarbonaat	Deoxyadenosine	Deoxycytidine
	Foetaal	Deoxyguanosine
Antioxi-dant	runderserum (FBS)	Adenosine
Alfa-liponzuur	Pasgeboren	Cytidine
	kalfserum	Guanosine
Antibioticum	Menselijk	Thymidine
Gentamicinesulfaat	transferrine	Uridine
	Fibroblast	
	groefactor (FGF)	
Aminozuren	Overige	
Alanine	Insuline	Ethylalcohol
Arginine	Progesteron	Thyromine
Asparagine	Testosteron	
Asparaginezuur	Beta-oestradiol	
Cysteine	Hydrocortison	Vitaminen en sporelementen
Glutaminezuur		Ascorbinezuur
Glutamine	pH-indicator	Foliumzuur
Glycine	Fenolrood	Nicolinamide
Histidine		Riboflavine
Isoleucine	Energie substraten	Thiamine
Leucine	Glucose	Pantotheenzuur
Lysine	Pyruvaat	Cobalamine
Methionine	Inositol	Pyridoxine
Fenylalanine		Biotine
Proline	Zouten en ionen	
Serine	Natriumchloride	Water
Treonine	Natriumseleniet	Farmaceutisch
Tryptofaan	Calciumchloride	kwali-teitswater
Tyrosine	Cholinechloride	Kaliumchloride
Valine	Kaliumfosfaat	(WFI)
	Magnesiumsulfaat	
	Natriumfosfaat	

KWALITEITSBORGING

STERILITEIT

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

VOORBEREIDING OP HET GEBRUIK

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

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

OPDELEN VAN CHANG Amnio

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

GEBRUIKSAANWIJZING

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

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

Gebruik van CHANG Amnio voor primaire kweken: flesmethode

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

Gebruik van CHANG Amnio voor het groeien van gepasseerde vruchtwatercellen:

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

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

NB: Vaak vormen er zich calciumoxalaatkristallen in CHANG Amnio. Uit onderzoek is gebleken dat de aanwezigheid van deze kristallen geen nadelig invloed heeft op de prestaties van het product.

Monsterpreparatie van chorionvilli:

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

Monsterkweek van chorionvilli:

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

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

BEWAREN EN STABILITEIT

Bewaars ingevoren bij een temperatuur lager dan -10 °C. Het product is stabiel tot de houdbaarheidsdatum op het etiket van de fles, mits het ingevoren wordt bewaard. Ongebruikt product kan worden opgedeel in praktische hoeveelheden en opnieuw worden ingevoren voor later gebruik of gedurende maximaal 30 dagen bij 2 °C tot 8 °C worden bewaard, mits stevig met de dop afgesloten. Het product mag maximaal twee keer opnieuw worden ingevoren. Bescherm tegen fluorescentielicht.

VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Dit hulpmiddel is bedoeld voor gebruik door personeel dat opgeleid is in procedures waaronder de aangegeven toepassing waarvoor het hulpmiddel is bedoeld. Gebruik geen flessen waarvan de steriele verpakking beschadigd is. Gebruik CHANG Amnio niet na de houdbaarheidsdatum op het etiket.

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

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

Preparering av prov från chorionvillbiopsi:

- Märk en petriskål för varje erhållet prov och överför biopsiinnehållet med aseptisk teknik. Tillsätt 5 ml av det förvarade CHANG Amnio komplett medium till skålen och ställ in skålen i inkubatorn i 30 minuter vid 35–39 °C, 5–8 % CO₂-atmosfär, för att låta blodet sjunka till botten.
- Rensa provet under ett dissektionsmikroskop, först med 1,5X förstoring och därefter med cirka 3X förstoring. Ann: En mängd på cirka 20–40 mg chorionvillbiopsi krävs.
- 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.
- Överför rena villi till en annan petriskål med förvämt CHANG Amnio komplett medium. Utför en sluttlig rensning genom att fatta tag i villi med en pincett och försiktigt skaka dem. Ann: Idealisk mängd är 5 mg per kultur. Undvik noga att skada de sköra villi.
- 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.
- Centrifugera villi vid cirka 1 400 rpm under 5 minuter.

Odling av chorionvillbiopsi:

- 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.
- Resuspendera pelleten försiktigt. Tillsätt 2 ml förvämt CHANG Amnio-medium till centrifugröret.
- Tillsätt 2 ml trypsin EDTA och inkubera kulturerna, utan att stora dem, i 10 minuter vid 35–39 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär. Ta ut röret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och placera röret i inkubatorn i 10 minuter till.
- Ta ut centrifugröret ur inkubatorn, resuspendera pelleten och centrifugera i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
- Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret. Resuspendera pelleten, tillsätt därefter 1 ml kollagenas till röret och sätt in röret i inkubatorn i 5 minuter.
- Ta ut röret ur inkubatorn och se efter om pelleten är grumlig och att inga distinkta stycken av enskilda villi kan ses. Om pelleten inte är grumlig, sätt tillbaka röret i inkubatorn i 5 minuter till.
- Tillsätt 3 ml förvämt CHANG Amnio till centrifugröret för att stoppa kollagenasets aktivitet.
- Centrifugera röret i 8–10 minuter vid 1 400 rpm.
- 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.
- Preparera ett optimalt antal kulturer med användning av 0,5 ml CHANG Amnio per kultur för varje petriskål som innehåller ett täckglas.
- Inkubera kulturerna, utan att stora dem, vid 35–39 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär.
- Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 1,5 ml förvämt CHANG Amnio.
- Efter 4 dagar bör kulturerna kontrolleras med avseende på växt. Om växt observeras, avlägsna mediet och tillsätt 2 ml färskt förvämt CHANG Amnio till varje täckglas. Kulturerna bör därefter tillföras näring varannan dag. För blodiga prover kan kulturerna kräva tätare byten av medium.
- 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.

Användning av CHANG Amnio för primärkulturer: *in situ*-metoder

- Centrifugera amnionväskan vid cirka 1 200 rpm under 10 minuter för att koncentrera cellerna.
- Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar cirka 0,5 ml av den centrifugerade amnionväskan (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 celluspensionen för att möjliggöra en sluttlig 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).
- Inkubera kulturerna, utan att stora dem, vid 37 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär.
- Flöda kulturerna på dag 2 genom att tillsätta 2 ml CHANG Amnio.
- 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.
- Kontrollera kulturerna med avseende på växt på eller efter dag 5 och skörda dem när tillräckligt många kolonier observeras.
- Bästa resultat erhålls när kulturerna tillförs näring med CHANG Amnio dagen innan de skördas.

Användning av CHANG Amnio för primärkulturer: Metoder med flaska

- Centrifugera amnionväskan vid cirka 1 200 rpm under 10 minuter för att koncentrera cellerna.
- Aspirera supernatanten från det centrifugerade röret men lämna kvar cirka 0,5 ml av den centrifugerade amnionväskan (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).
- Inkubera kulturerna, utan att stora dem, vid 37 °C i 5–8 % CO₂-atmosfär.
- Kontrollera kulturerna med avseende på växt på dag 5. Byt ut mediet mot 2 ml färskt CHANG Amnio och skörda om tillräcklig cellväxt observeras.
- 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.
- 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. Proteasbehandling 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.

INDIKATIONER

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

- primärodling av celler i amnionvätska
- odling av celler från amnionvätska från passage
- fast amnionvävnad från chorionvillbiopsi.

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

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

PRODUKTBESKRIVNING

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

KOMPONENTER

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

KVALITETSSÄKRING

STERILITET

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

BEREDNING FÖR ANVÄNDNING

Tina upp mediet vid rumstemperatur på en steril arbetsbank 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

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

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

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

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Denna produkt är avsedd att användas av personal med utbildning i procedurer som omfattar den indicerade tillämpning för vilken produkten är avsedd. Flaskor vars sterila förpackning inte är intakt får inte användas.

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

LIETUVIŲ K.

NAUDOJIMO INDIKACIJA

- Gentamicinu ir L glutamino papildyta „CHANG Amnio“ terpė gali būti naudojama pagal tokią paskirtį:
1. amniono skysčio lašelių pirminei kultūrai;
 2. auginant perkeltas amniono skysčio ląsteles;
 3. tvirto amniono audiniui, gautam paėmus chorioninių išaugų (gaurelių) mėginius.

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

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

ĮTAISO APRÁŠYMAS

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

SUDEDAMOSIOS DALYS

Buferiai Natrio bikarbonatas	Baltymai, hormonai ir augimo faktoriai Jaučio embriono kraujo serumas	Magnio sulfatas Natrio fosfatas
Antioksidantas Lipo rūgštis	kraujo serumas Jaučio naujagimio kraujo serumas	Nukleino rūgštys Deoksadenozinas Deoksitidinas Deoksiguanozinas
Antibiotikinis Gentamicino sulfatas	Žmogaus transferinas Fibroblasto augimo faktorius (FGF) Insulinas Progesteronas Testosteronas	Adenozinas Cilidinas Guanozinas Timidinas Uridinas
Aminorūgštis Alaninas Argininas Asparaginas Asparto rūgštis Cisteinas Glutamo rūgštis Glutaminas Glicinas Histidinas Izoleucinas Leucinas Lizinas Metioninas Fenilalaninas Prolinas Serinas Treoninas Triptofanas Tirozinas Valinas	Beta estradiolis Hidrokortizonas pH indikatorius Fenolio raudonasis	Kiti Etlio alkoholis Tironinas Vitaminai ir mikroelementai Askorbo rūgštis Folio rūgštis Nikotinamidas Riboflavinas Tiaminas Pantotėninė rūgštis Kobalaminas Piridoksinas Biotinas Vanduo Injekcinio vandens kokybė
	Energėtiniai sustatinaliai Gliukozę Piruvatas Inozitolis	
	Druskos ir jonai Natrio chloridas Natrio selenitas Kalcio chloridas Cholino chloridas Kalto chloridas Kalto fosfatas	

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

STERILUMAS

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

PARUOŠIMAS NAUDOTI

Atitirpinkite ant stiliaus 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 pakartotina užšaldykite.
3. Kai būsite pasirėngę naudoti, atšildykite alikvotines dalis 37 °C temperatūros vandens vonelėje.

NAUDOJIMO NURODYMAI

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

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

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas pirminėms kultūroms: Kolbos metodologijos

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

„CHANG Amnio“ terpės naudojimas persėtoms vaisiaus vandenu laštelėms 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 vandenu laštelės turi didesnį polinkį jautriau reaguoti į apdorojimą proteazėmis negu įprastinėje terpėje augintos vaisiaus vandenu laštelės. Gali prireikti pakeisti protokolą, kad galėtumėte atsivelti į šį faktą.

Pastaba. Pasėliams maitinti naudojamos terpės rūgštingumas turi būti pH 6,65–7,44. (t. y. terpė turi būti šiek tiek gelsvai lašinės spalvos). pH galima lengvai pakoreguoti terpę apie 30 minučių palaikant 5–8 % CO₂ inkubatoriuje su šiek tiek atsuktą dangtelį.

Pastaba. Dažnai „CHANG Amnio“ terpėje susidaro kalcio oksalato kristalai. Nenusatlyta, kad šių kristalų buvimas kaip nors pakentų produkto funkciniams savybėms.

Chorioninių gaurelių mėginio paruošimas

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

Chorioninių gaurelių mėginio pasėlis

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

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

LAIKYMAS IR STABILUMAS

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

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.

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 хорнионни въси.

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

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

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

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

КОМПОНЕНТИ

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

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

СТЕРИЛНОСТ

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

ПОДГОТОВКА ЗА УПОТРЕБА

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

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

АЛИКВОТИРАНЕ НА CHANG Amnio

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

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

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

1. Центрофугируйте амниотичната течност при приблизително 1200 rpm за 10 минути, за да концентрирате клетките.
2. Аспирируйте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки приблизително 0,5 ml над pelletata от клетки (или около 2x обема на pelletata) центрофугирана амниотична течност. Разделете на аликвотни части супернатанта (поне 1 ml, ако е възможно) за анализи на алфа-фетопротейн (AFP) и ацетилхолинестераза, ако е необходимо. Ако спесиментът съдържа кръв, пригответе допълнителна аликвотна част за последващо тестване. Ресуспендирайте pelletata 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 pelletata от клетки), или 2 ml на слайд-флакони. Ако спесиментът е получен от пациента в третия триместър на бременността, pelletata може да е по-голяма, но да съдържа по-малко жизнени клетки, което ще изисква по-сериозно засаждане (по-малко среда от нормалното).
3. Инкубирайте културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера.
4. В ден 2 залейте културите, като добавите 2 ml CHANG Amnio.
5. След 4 до 5 дни културите трябва да бъдат проверени за растеж. След като бъде установен растеж, културите трябва да се захванат. Хранете културите, като отстранявате целия супернатант на културата и го заменете с 2 ml прясна CHANG Amnio. Препоръчва се културите да се захванат 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 захванат с CHANG Amnio в деня преди събирането.

Използване на CHANG Amnio за първични култури: Методология със слайд-флакони

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

3. Инкубирайте културите в покой при 37° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера.
4. Проверете за растеж в ден 5. Сменете средата с 2 ml прясна CHANG Amnio и съберете, ако се наблюдава достатъчен растеж на клетките.
5. Проверявайте културите за растеж и сменяйте изцяло средата всеки ден след това, докато се установят достатъчно колонии и са готови за събиране. За спесимени с кръв културите може да изискват по-честа смяна на средата.
6. Най-добри резултати се постигат, когато културите се захванат 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 захванане на културите, трябва да е между 6,65 и 7,44 (т.е. средата трябва да е с леко жълтеникаво розово-оранжево цвят). Нивото на pH може лесно да се регулира чрез поставяне на средата в 5% – 8% CO₂ инкубатор с леко разхлабена капачка за около 30 минути.

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

Подготовка на проба на хорнионни въси:

1. Обозначете с етикет петриевото блюдо за всеки получен спесимен и прехвърлете асептично съдържанието на пробата. Добавете 5 ml от предварително затоплена завършена среда CHANG Amnio в бледото и поставете в инкубатор за 30 минути при 35° C – 37° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера, за да може кръвта да се утаи.
2. Почистете спесимена с помощта на стереомикроскоп, първоначално с оптично увеличение 1,5 X пъти, след което го регулирайте до около 3 X пъти. Забележка: Необходими са приблизително 20 – 40 µg от проба на хорнионни въси.
3. С помощта на две стерилни пинцети отстранете кръвните съсиреси и всякакъв материал от маточна лигавица от материала от въси, докато работите в бледото под стереомикроскопа. Материалът от въси е със съветъл цвят, трябвавиден и/или на бучки, с видими разклонения и вени.
4. Прехвърлете чистите въси в друго петриевото блюдо с предварително затоплена завършена среда CHANG Amnio. Извършете окончателно почистване, като използвате шпилци, за да хванете въсите и леко разбъркайте. Забележка: Идеалното количество за използване е 5 µg на култура. Внимавайте да не увредите крехките въси.
5. Прехвърлете въсите и средата в центрофужна епруветка от 15 ml и добавете 4 капки антибиотик (т.е. Гентамицин сулфат, 50 µl/ml) към епруветката. Оставете да престои за 30 минути.
6. Центрофугируйте въсите при приблизително 1400 rpm за 5 минути.

Култура от проба на хорнионни въси:

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

3. Добавете 2 ml трипсин-ЕДТА и инкубирайте културата в покой при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера за 10 минути. Отстранете епруветката от инкубатора, ресуспендирайте pelletata и поставете в инкубатор за още 10 минути.
4. Отстранете центрофужната епруветка от инкубатора, ресуспендирайте pelletata и центрофугируйте за 8 – 10 минути при 1400 rpm.
5. Аспирируйте супернатанта от центрофужната епруветка. Ресуспендирайте pelletata, след това добавете 1 ml колагеназа към епруветката и поставете в инкубатор за 5 минути.
6. Отстранете от инкубатора и визуално проверете дали pelletata е мътна и не могат да се видят отделни части от отделните въси. Ако pelletata не е мътна, поставете я отново в инкубатора за още 5 минути.
7. Добавете 3 ml предварително затоплена CHANG Amnio към центрофужната епруветка, за да спрете действието на колагеназата.
8. Центрофугируйте епруветката за 8 – 10 минути при 1400 rpm.
9. Аспирируйте супернатанта от центрофугираната епруветка, оставяйки 0,5 ml среда над pelletata от клетки. Ресуспендирайте pelletata преди добавяне на CHANG Amnio, използвана за приготвяне.
10. Пригответе оптимален брой култури, като използвате 0,5 ml CHANG Amnio на култура, за всяко петриевото блюдо с покривно стъкло.
11. Инкубирайте културите в покой при 35° C – 39° C, 5% – 8% CO₂ атмосфера.
12. В ден 2 залейте културите, като добавите 1,5 ml предварително затоплена CHANG Amnio.
13. На 4 дни културите трябва да се проверяват за растеж. Ако се наблюдава растеж, отстранете средата 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 захванат 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 пълно затворен с капачка и съхранен при температура от 2° C до 8° C за до 30 дни. Той може да бъде замразяван максимум два пъти. Пазете от флуоресцентна светлина.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

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

SLOVENČINA

INDIKÁCIA NA POUŽITIE

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

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

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

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

POPIS ZARIADENIA

CHANG Amnio je kompletne médium určené na priame použitie pri primárnej kultivácii buniek plodovej vody (AFC), odbere vzoriek choriových kľkov (CVS) a produktoch na počatie (POC) na použitie pri karyotypovaní a iných prenatalných genetických testoch. Je optimalizovaný pre metódky fliašiek aj in situ. Tento produkt obsahuje antibiotikum gentamicínsulfát (50 µg/ml).

ZLOŽKY

Pufre hydrogénuhličitan sodný	Bielkoviny, hormóny a rastové faktory fetálne bovinné sérum (FBS) neonatale bovinné sérum ľudský transferín fibroblastový rastový faktor (FGF) inzulín progesterón testosterón beta estradiol hydrokortizon	siran horečnatý fosfát sodný
Antioxidační kyselina tioktová	Nukleové kyseliny deoxyadenozin deoxycytidín deoxyguanozín adenozin cytidín guanozín tymidín uridín	Nú etylalkohol tyroín
Antibiotikum gentamicínsulfát	Vitamíny a stopové prvky kyselina askorbová kyselina listová glukóza nikotinamid riboflavín tiamin kyselina pantoténová kobalamin pyridoxín biotín	
Aminokyseliny alanín arginín asparagín kyselina asparagová cysteín kyselina glutamová glutamín glycín histidín izoleucín leucín lyzín metionín fenylalanín prolín serín treonín tryptofán tyrozín valín	Indikátor pH fenolová červená	Voda kvalita vody na injekciu
	Energetické substráty glukóza pyruvát inositol	
	Soli a ióny chlorid sodný seleničitan sodný chlorid vápenatý cholin vápenatý chlorid draselný fosforečnan draselný	

KONTROLA KVALITY

STERILITA

Sérum použité pri výrobe CHANG Amnio bolo testované na vírusovú kontamináciu podľa CFR, kapitoly 9, časti 113.53. Podstúpilo tiež skríning na 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

Rozmrzte 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 sú pripravené na použitie.

NÁVOD NA POUŽITIE

CHANG Amnio použite na primárne kultúry: metódky in situ

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

CHANG Amnio použite na primárne kultúry: Metódky fliaštičiek

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

Použitie CHANG Amnio na rast pasážovaných buniek plodovej vody:

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

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

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

Príprava vzorky z choriových kľkov:

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

Kultivácia vzorky z choriových kľkov:

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 odstredovanie 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 % CO₂ 10 minút. Skúmavku vyberte z inkubátora na ďalších 10 minút.
4. Skúmavku na odstredovanie vyberte z inkubátora, resuspendujte peletu a odstreďte ju 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
5. Z odstredenej skúmavky aspirujte supernatant. Peletu resuspendujte, potom do skúmavky pridajte 1 ml kolagenázy a vložte ju do inkubátora na 5 minút.
6. Vyberte z inkubátora a zrakom skontrolujte, či peleta nie je zakalená a či nie je vidieť zjavné kusy jednotlivých kľkov. 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 odstredovanie, aby sa zastavilo pôsobenie kolagenázy.
8. Skúmavku odstreďte 8 – 10 minút pri 1 400 otáčok za minútu.
9. Supernatant aspirujte z odstredenej skúmavky, pričom ponechajte 0,5 ml média nad bunkovou peletou. Peletu resuspendujte skôr, než pridáte CHANG Amnio použité na prípravu.
10. Pripravte optimálny počet kultúr s použitím 0,5 ml CHANG Amnio na jednu kultúru na každú Petriho misku, ktorá obsahuje krycie skličko.
11. Nerušené kultúry inkubujte pri teplote 35 °C – 39 °C v atmosfére 5 % – 8 % CO₂.
12. Druhý deň zalejte kultúry pridaním 1,5 ml zahriateho roztoku CHANG Amnio.
13. Po 4 dňoch skontrolujte rast na kultúrach. Ak pozorujete rast, odstráňte médium a pridajte 2 ml čerstvého zahriateho roztoku CHANG Amnio na každé krycie skličko. Potom sa majú kultúry príziviť 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 prízivené CHANG Amnio deň pred zberom.

UCHOVÁVANIE A STABILITA

Uchovávajte zmrazené pri teplote pod -10 °C. Produkt bude stabilný až do dátumu expirácie na označení fľaše, ak sa uchováva zmrazený. Nepoužitý produkt možno nádávovať 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 náúzu, ktorej sterilný obal bol narušený. CHANG Amnio nepoužívajte po dátume expirácie uvedenom na označení.