



Vitrification Thaw Kit (Vit Kit - Thaw)

with Gentamicin and DSS

Catalog No. 90137-SO Includes:

• Thawing Solution - TS (yellow cap)	4 x 2 ml Vials
• Dilution Solution - DS (orange cap)	1 x 2 ml Vials
• Washing Solution - WS (red cap)	1 x 2 ml Vials

Catalog No. 90137-DSOC Includes:

• Thawing Solution - TS (yellow cap)	8 x 2 ml Vials
• Dilution Solution - DS (orange cap)	5 x 2 ml Vials
• Washing Solution - WS (red cap)	5 x 2 ml Vials

For assisted reproductive procedures.

Für assistierte Reproduktionsverfahren.

Per tecniche di riproduzione assistita.

Para utilización en técnicas de reproducción asistida.

Pour procédures de procréation médicalement assistée.

Para técnicas de reprodução assistida.

Για διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Pro postupy asistované reprodukce.

Til assisteret reproduktionsbehandling.

Avusteisiin lisääntymismenetelmiin.

Ar palīdzīdzekļiem veicamām reproduktīvām procedūrām.

Voor geassisteerde voortplantingsprocedures.

Do procedur wspomaganego rozrodu.

Pentru proceduri de reproducere asistată.

För procedurer för assisterad befruktning.

Kasutamiseks abistatud viljastamisprotseduurides.

Asszisztált reprodukciós eljárásokhoz.

Skirta pagalbinio apvaisinimo procedūroms.

Yardımcı üreme işlemleri içindir.

Na postupy asistovanej reprodukcie.

За асистирани репродуктивни процедури.

Za postupke potpomognute oplodnje.

Għall-proceduri ta' riproduzzjoni assistita.

Za postopke asistirane reprodukcije.

Glossary of Symbols:

	Catalog Number
	Lot Number
	Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)
	Expiration: Year - Month - Day
	Caution, consult accompanying documents
	Consult instructions for use
	Storage Temperature 2-8°C
	Do Not Re-Sterilize
	Do Not Use If Package Is Damaged
	Phthalate, DBP, DEHP
	Manufacturer
	U.S. Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare practitioner.
	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.

CryoTip Diagrams:

Figure 1:

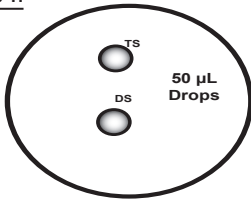


Figure 2:

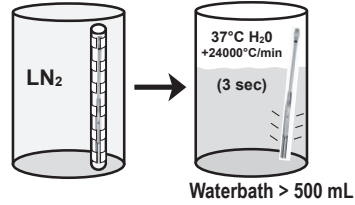


Figure 3:

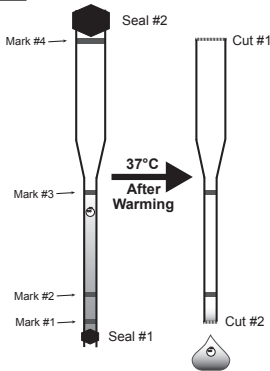
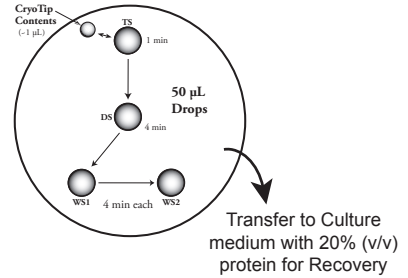
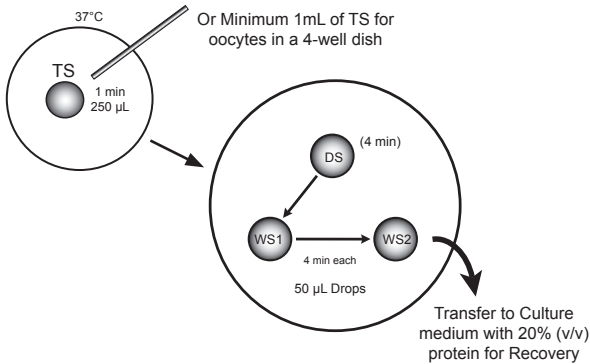


Figure 4:

TS = Thawing Solution
DS = Dilution Solution
WS = Washing Solution



HSV Device Diagrams:



Cryolock Diagrams:

Figure 1:

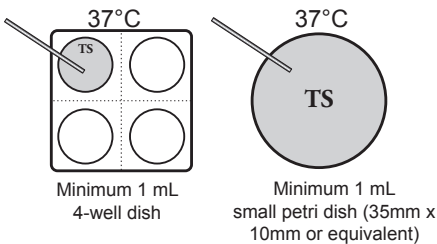
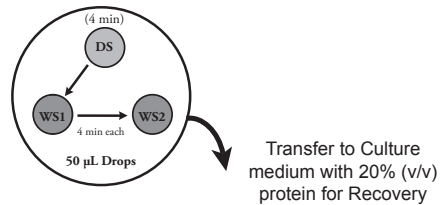


Figure 2:



ENGLISH

EU CAUTION: For Professional Use Only.

INDICATION FOR USE

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) is intended for use in the thawing of vitrified oocytes (MII), pronuclear (PN) zygotes through day 3 cleavage stage embryos and blastocyst stage embryos that have been vitrified using Vitrification Freeze Kit (Catalog #90133-SO)

DEVICE DESCRIPTION

Thawing Solution-TS is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing Gentamicin Sulfate, 1.0 M sucrose and 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing Gentamicin Sulfate, 0.5M sucrose and 20% (v/v) DSS.

Washing Solution-WS is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing Gentamicin Sulfate and 20% (v/v) DSS.

DSS is a protein supplement consisting of 50 mg/mL therapeutic grade Human Serum Albumin (HSA) and 20 mg/mL Dextran. DSS is used at 20% (v/v) in Vit Kit-Thaw for a final concentration of 10 mg/mL HSA and 4 mg/mL Dextran.

These three solutions are to be used in sequence according to the step-wise microdrop warming protocol.

COMPOSITION

<u>Salts and Ions</u>	Nicotinic Acid Amide	<u>Protein Source</u>	Lysine	Hydroxyproline
Sodium Chloride	Pantothenic Acid	Human Serum Albumin	Proline	Cystine
Sodium Phosphate	Riboflavin	<u>Buffers</u>	Tyrosine	<u>Other</u>
Potassium Chloride	Pyridoxine	Sodium Bicarbonate	Alanine	Guanine
Magnesium Sulfate	Thiamine	HEPES	Aspartic Acid	Hypoxanthine
Sodium Acetate	Biotin	<u>pH Indicator</u>	Glutamic Acid	Thymine
Calcium Chloride	Alpha-Tocopherol	Phenol Red	Isoleucine	Uracil
Ferric Nitrate	Sodium Bisulfite	<u>Macromolecules</u>	Leucine	Xanthine
Choline Chloride	<u>Antioxidant</u>	Sucrose	Methionine	Adenosine
<u>Vitamins and Minerals</u>	Glutathione	Dextran	Phenylalanine	Adenine Sulfate
Ascorbic Acid	<u>Antibiotic</u>	<u>Amino Acids</u>	Serine	Deoxyribose
Aminobenzoic Acid	Gentamicin Sulfate	Arginine	Threonine	Ribose
Calciferol	<u>Energy Substrates</u>	Glycine	Tryptophan	<u>Water</u>
Folic Acid	Glucose	Histidine	Valine	WFI Quality
Nicotinic Acid	Inositol		Cysteine	

QUALITY ASSURANCE

The solutions in Vit Kit-Thaw are membrane filtered and aseptically processed according to manufacturing procedures which have been validated.

Each lot of Vit Kit-Thaw receives the following tests:

Solutions:

- Endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) methodology (≤ 0.6 EU/ml)
- Mouse Embryo Assay (one-cell) ($\geq 80\%$ expanded Blastocyst)
- Sterility by the current USP Sterility Test <71> (Pass)

All results are reported on a lot specific Certificate of Analysis which is available upon request.

FOR WARMING CRYOTIP AS THE CARRIER:

MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Connector (Catalog #40736) or adaptor
- Sterile petri dishes (50 X 9 mm, Falcon 351006 or equivalent)
- Disposable gloves
- Hamilton GASTIGHT® Syringe (50 μ l) catalog #80901
- Transfer pipettes (pulled glass pipettes or micropipette tips with an inner tip diameter of ~ 200 μ m)
- Tweezers
- Stopwatch or timer
- Liquid nitrogen reservoir (dewar or styrofoam container with lid, 1-2 L volume)
- Liquid nitrogen (sufficient volume to achieve 4 inch depth in reservoir)
- Sharp scissors (sterile)
- 37°C waterbath
- Culture medium with protein, pre-equilibrated to 37°C in CO₂ incubator prior to thawing procedure.
- 37°C incubator without CO₂, or heating stage.

DIRECTIONS FOR USE

Vit Kit-Thaw components (per application):

- 50 μ l of Thawing Solution –TS
- 50 μ l of Dilution Solution-DS
- 100 μ l of Washing Solution-WS
- 1 Connector

WARMING PROTOCOL

(FOR OOCYTES AND EMBRYOS):

NOTE: Procedures are to be done at room temperature (20-27°C). DO NOT use heated microscope stage for the following procedures.
CAUTION: Minimize exposure of specimen to light during manipulations through thawing solutions.

1. Bring the quantity to be used of TS, DS and WS to room temperature (20-27°C) prior to warming vitrified specimens.
NOTE: Avoid bringing the entire vials of TS, DS and WS to room temperature repeatedly when a small quantity of the solution is needed each time. It is better to aliquot the quantity to be used and return the vials to 2-8°C right after aliquoting.
2. Fill the liquid nitrogen reservoir with liquid nitrogen (~80 % full) and place close to the LN₂ freezer containing the specimens to be thawed.
3. Remove the canes with goblets containing the CryoTips with vitrified specimens from liquid nitrogen storage and transfer them into the liquid nitrogen filled reservoir.
CAUTION: Make sure that CryoTips remain submerged in LN₂ (in goblet) during transfer from storage to LN₂ reservoir to prevent uncontrolled thawing of specimens.
Place the reservoir close to the microscope for rapid manipulation.
4. Label a sterile petri dish (or lid) with necessary information.
5. Gently invert each vial of TS, DS and WS twice to mix contents before use.
6. Prepare the dish with droplets of solutions for warming protocol as follows:
Aseptically dispense a sequence of 2 microdrops on an inverted lid of sterile Petri dish as shown in Figure 1, and place the dish on the microscope stage:
 - one-50 µl drop of TS
 - one-50 µl drop of DS
 - (Two drops of WS will be set up later at step 11)
7. Place the 37°C waterbath close to the microscope. Have the following nearby: a transfer pipet and tips, sterile sharp scissors, Hamilton syringe and sterile wipes.
8. Using tweezers (or tongs), retrieve the specific CryoTip from the cane in liquid nitrogen, quickly immerse the CryoTip into the 37°C waterbath (≥ 500 ml) and swirl gently for 3 seconds to warm (see Figure 2) at + 24,000°C/min.
9. Quickly dispense contents of CryoTip as follows (see Figure 3):
 - Quickly wipe the CryoTip dry with a sterile wipe
 - Remove metal cover sleeve
 - Cut the seal on the wide end of the CryoTip at Mark #4
 - Attach wide end of the CryoTip securely to Hamilton syringe or appropriate aspiration tool using a connector or adaptor.
NOTE: Lift up the plunger of the syringe about 0.5 inches before attaching the syringe to the Connector and the CryoTip.
 - Gently wipe the fine tip dry with a sterile wipe.
 - With the CryoTip positioned over the prepared thawing dish, quickly cut the seal on the Mark #2 of the fine tip end and dispense the contents of the CryoTip as a small drop (~ 1 µl) onto a dry region of the dish above the TS drop (see Figure 4).
NOTE: AVOID BUBBLES WHILE DISPENSING THE CONTENTS.
10. Merge the TS drop with the CryoTip content and allow gradual mixing for 1 minute (see Figure 4).
Note: the specimens will shrink and float to the top of the drop.
NOTE: After each transfer of the specimen(s), blow out any remaining fluid in the transfer pipet and draw up some solution from the next drop prior to the next manipulation. Avoid creating bubbles during the transfers.
11. Draw up some DS into the transfer pipet and transfer the specimen(s) from the drop of TS with minimal volume to the drop of DS for 4 minutes.
NOTE: The specimen will remain shrunken during exposure to DS.)
DURING THIS TIME SET UP THE TWO-50 µl DROPS OF WS (WS1, WS2), AS SHOWN IN FIGURE 4.
12. Transfer the specimen(s) to the drop of WS (WS1) for 4 minutes.
NOTE: The specimen(s) should re-expand to the original size within 2-3 minutes in WS.
13. Then transfer the specimen(s) to the second drop of WS (WS2) for 4 minutes.
14. Transfer warmed OOCYTE(S) to pre-equilibrated culture medium with 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml for recovery (2-3 hours to allow time for spindle re-formation) prior to subsequent manipulations.
There are two options for warmed EMBRYO(S):
 - a) For immediate transfer to patient: transfer EMBRYO(S) to pre-equilibrated 'transfer' medium containing 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml.
 - b) For further culture: transfer EMBRYO(S) to pre-equilibrated culture medium containing 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml for a 4 hour recovery period. After recovery period, transfer EMBRYO(S) to culture medium with 10% (v/v) protein and incubate accordingly until desired developmental stage has been reached for transfer to patient.

FOR WARMING HSV DEVICE AS THE CARRIER:

MATERIAL REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Sterile 4-well dish (Nunc 179830, 144444 or equivalent), or organ culture dish (BD Falcon 353037)
- Disposable gloves
- Transfer pipettes
- Tweezers
- Stopwatch or timer
- Liquid nitrogen reservoir
- Liquid nitrogen
- Scissors, Knipex or other wire cutter device
- Culture medium with protein, pre-equilibrated to 37°C in CO₂ incubator prior to thawing procedure.
- 37°C incubator without CO₂, or heating stage

DIRECTIONS FOR USE

Vit Kit-Thaw components (per application)

- 250 µl of Thawing Solution –TS
- 50 µl of Dilution Solution – DS
- 100 µl of Washing Solution – WS

WARMING PROTOCOL

(FOR OOCYTES AND EMBRYOS):

NOTE: The warming steps include plunging the device into the 37°C TS and subsequent diluting and washing in DS and WS at room temperature

1. Set up warming dishes (as shown in HSV device diagram):
 - At 37°C: Aseptically dispense 250 µl of TS into a sterile 4-well dish or an organ culture dish and place it in a 37°C incubator without CO₂ or on a heating stage at least 30 minutes prior to warming procedure

NOTE: For oocytes, dispense a minimum of 1 ml of TS

2. Identify HSV Straw(s) to be warmed from LN₂ storage and quickly transfer to LN₂ filled reservoir in preparation for thawing procedure.
3. Place LN₂ reservoir close to microscope for subsequent rapid manipulation.
4. Remove TS dish from 37°C incubator or heating stage and place it under focus on top of the microscope stage.
5. Lift the straw enough to expose the colored handling rod. Make sure the end with the specimen(s) remains immersed in the LN₂.
6. Use a Knipex (or other wire cutter device) to cut the straw at the height of the colored handling rod. The red cut-length guide on the Knipex should be positioned in maximum length position or removed.
 - Alternatively, use fingers and thumb to spin the straw while making cutting movements with scissors, 10 mm under the top of the colored handling rod.
7. With one swift but controlled motion, quickly grab the handling rod and extract it out of the straw.
8. Immediately plunge the gutter into the 37°C TS and gently swirl to detach specimens from device and leave it for 1 minute.

Steps 9-12 must be performed at room temperature (22-27°C).

- At room temperature: Aseptically dispense one (1) 50 µl drop of DS on a sterile Petri dish

9. Draw up some DS into the transfer pipette and transfer the specimen(s) from the TS drop with minimal volume to the drop of DS for 4 minutes.

NOTE: The specimen will remain shrunken during exposure to DS.

DURING THIS TIME SET UP THE TWO-50 µl DROPS OF WS (WS1, WS2), AS SHOWN IN HSV DEVICE DIAGRAM.

10. Transfer the specimen(s) to the drop of WS (WS1) for 4 minutes.

NOTE: The specimen(s) should re-expand to the original size within 2-3 minutes in WS.

11. Then transfer the specimen(s) to the second drop of WS (WS2) for 4 minutes.
12. Transfer warmed OOCYTE(S) to pre-equilibrated culture medium with 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml for recovery (2-3 hours to allow time for spindle re-formation) prior to subsequent manipulations.

There are two options for warmed EMBRYO(S):

- a) For immediate transfer to patient: transfer EMBRYO(S) to pre-equilibrated 'transfer' medium containing 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml.
- b) For further culture: transfer EMBRYO(S) to pre-equilibrated culture medium containing 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml for a 4 hour recovery period. After recovery period, transfer EMBRYO(S) to culture medium with 10% (v/v) protein and incubate accordingly until desired developmental stage has been reached for transfer to patient.

NOTE: Recovered oocytes must be fertilized using ICSI for optimal fertilization after vitrification.

FOR WARMING CRYOLOCK™ AS THE CARRIER:

MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Sterile 4-well dish or sterile small petri dishes (35 X 10 mm or equivalent)
- Disposable gloves
- Transfer pipettes
- Stopwatch or timer
- Liquid nitrogen reservoir
- Liquid nitrogen
- Culture medium with protein, pre-equilibrated to 37°C in CO₂ incubator prior to thawing procedure
- 37°C incubator without CO₂ or heating stage
- Forceps

DIRECTIONS FOR USE

Vit Kit-Thaw components (per application)

- 1 ml of Thawing Solution – TS
- 50 µL of Dilution Solution – DS
- 100 µL of Washing Solution – WS

WARMING PROTOCOL

NOTE: The warming steps include plunging the device into the 37°C TS and subsequent diluting and washing in DS and WS at room temperature

1. Set up thawing dish (as shown in Cryolock diagram, Figure 1):
 - At 37°C: Aseptically dispense a minimum volume of 1 ml of TS and warm to 37°C in an incubator without CO₂ or on a heating stage at least 30 minutes prior to starting warming procedure.
2. Identify the Cryolock sample(s) to be warmed and quickly transfer from LN₂ storage to an LN₂ filled holding reservoir in preparation for warming procedure.
3. Place LN₂ filled holding reservoir in close proximity to the working area and stage of the microscope in order to achieve subsequent rapid manipulation from reservoir to TS.
4. Remove TS dish from 37°C incubator or heating stage and place it under focus on top of the microscope stage.
5. Using forceps, hold the upper end of the Cryolock body with the identification label facing up.
 - Option A: Quickly but gently remove the cap under LN₂, twisting the parts until release.
 - Option B: Quickly take the Cryolock out from the LN₂, then quickly remove the cap with a gentle twist.

NOTE: Laboratory should consult their own procedures and protocols. Option A is not cleared for use in the U.S.

6. Immediately plunge the concave tip of the Cryolock, with the specimen(s) facing up, into the 37°C TS. Under microscopic observation, gently move the Cryolock until the specimen(s) are released from the tip.
7. Leave the specimen(s) for a total of 1 minute in the TS.
8. Thirty (30) seconds following the initial plunge, gently pipette the specimen(s), if floating, and place at the bottom of the TS.

Steps 9-12 must be performed at room temperature (22-27°C).

- At room temperature: Aseptically dispense one (1) 50 µL drop of DS on a sterile petri dish (see Cryolock diagram, Figure 2)

9. Transfer specimen(s) to DS for 4 minutes. Gently pipette specimens once to ensure complete rinse in DS.

NOTE: The specimen will remain shrunken during exposure to DS.

10. During the 4 minute exposure in DS, aseptically dispense two (2) 50 µL drops of WS (WS1, WS2) as shown in diagram.

11. Transfer specimen(s) to WS1 then WS2 for 4 minutes each, undisturbed.

NOTE: The specimen(s) should re-expand to the original size within 2-3 minutes in WS.

12. Transfer warmed OOCYTE(S) to pre-equilibrated culture medium with 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml for recovery (2-3 hours to allow time for spindle re-formation) prior to subsequent manipulations.

There are two options for warmed EMBRYO(S):

- a) For immediate transfer to patient: transfer EMBRYO(S) to pre-equilibrated 'transfer' medium containing 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml.
- b) For further culture: transfer EMBRYO(S) to pre-equilibrated culture medium containing 20% (v/v) protein supplement or 12 mg/ml for a 4 hour recovery period. After recovery period, transfer EMBRYO(S) to culture medium with 10% (v/v) protein and incubate accordingly until desired developmental stage has been reached for transfer to patient.

For additional details on the use of these products, each laboratory should consult its own laboratory procedures and protocols which have been specifically developed and optimized for your individual medical program.

STORAGE INSTRUCTIONS AND STABILITY

Store the unopened vials refrigerated at 2°C to 8°C. When stored as directed, Vitrification Thaw Kit Solutions are stable until the expiration date shown on the vial labels.

Do not use media for more than eight (8) weeks once containers have been opened.

As human source material is present in the product it may develop some particulate matter during storage. This type of particulate matter is not known to have an effect on product performance.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

This device is intended to be used by staff trained in assisted reproductive procedures. These procedures include the intended application for which this device is intended.

The user facility of this device is responsible for maintaining traceability of the product and must comply with national regulations regarding traceability, where applicable.

Do not use any vial of solution which shows evidence of damage, leaking, particulate matter, cloudiness or has shifted color. Discard the product in accordance with applicable regulations.

To avoid problems with contamination, handle using aseptic techniques.

Currently, research literature indicates the long-term effects of vitrification on oocytes and embryos remains unknown.

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

EU: Standard measures to prevent infections resulting from the use of medicinal products prepared from human blood or plasma include selection of donors, screening of individual donations and plasma pools for specific markers of infection and the inclusion of effective manufacturing steps for the inactivation/removal of viruses. Despite this, when medicinal products prepared from human blood or plasma are administered, the possibility of transmitting infective agents cannot be totally excluded. This also applies to unknown or emerging viruses and other pathogens. There are no reports of proven virus transmissions with albumin manufactured to European Pharmacopeia specifications by established processes. It is strongly recommended that every time Irvine Scientific, LLC Reproductive Media Products culture media are administered to a patient, the name and batch number of the product are recorded in order to maintain a link between the patient and the batch of the product.

US: This product contains Human Serum Albumin (HSA). Human source material used in the manufacture of this product has been tested by FDA-licensed kits and found to be non-reactive to the antibodies to Hepatitis C (HCV), and antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV). However, no test method offers complete assurance that products derived from human sources are noninfectious. Handle all human source material as if it were capable of transmitting infection, using universal pre-cautions. Donors of the source material have also been screened for CJD.

CONTRAINDICATION

Product contains Gentamicin Sulfate. Appropriate precautions should be taken to ensure that the patient is not sensitized to this antibiotic.

DEUTSCH

EU-VORSICHTSHINWEIS: Nur für den professionellen Einsatz.

INDIKATIONEN

Vit Kit-Thaw (Vitrifikations-Auftaukit) ist für die Verwendung beim Auftauen von vitrifizierten Oozyten (MII) und Zygoten im Vorkernstadium (PN) bis zu Embryos im Teilungsstadium am Tag 3 und Blastozystenstadium vorgesehen, die mit dem Vitrification Freeze Kit (Bestell.-Nr. 90133-SO) vitrifiziert wurden.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Thawing Solution-TS ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium 199 und enthält Gentamicinsulfat, 1,0 M Saccharose und 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium 199 und enthält Gentamicinsulfat, 0,5 M Saccharose und 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium 199 und enthält Gentamicinsulfat und 20 % (v/v) DSS.

DSS ist ein Proteinzusatz und setzt sich aus 50 mg/ml Humanalbumin (HSA, für therapeutische Zwecke geeignet) und 20 mg/ml Dextran zusammen. DSS wird zu 20 % (v/v) im Vit Kit-Thaw bei einer Endkonzentration von 10 mg/ml HSA und 4 mg/ml Dextran verwendet.

Diese drei Lösungen werden nacheinander gemäß dem schrittweisen Erwärmungsprotokoll in Mikrotropfen eingesetzt.

ZUSAMMENSETZUNG

<u>Salze und Ionen</u>	Nikotinsäureamid	<u>Proteinquelle</u>	Lysin	Hydroxyprolin
Natriumchlorid	Pantothensäure	Humanalbumin	Prolin	Cystin
Natriumphosphat	Riboflavin	<u>Puffer</u>	Tyrosin	<u>Andere</u>
Kaliumchlorid	Pyridoxin	Natriumbicarbonat	Alanin	Guanin
Magnesiumsulfat	Thiamin	HEPES	Asparaginsäure	Hypoxanthin
Natriumacetat	Biotin	<u>pH-Indikator</u>	Glutaminsäure	Thymin
Calciumchlorid	Alpha-Tocopherol	Phenolrot	Isoleucin	Uracil
Eisennitrat	Natriumhydrogensulfid	<u>Makromoleküle</u>	Leucin	Xanthin
Cholinchlorid	<u>Antioxidans</u>	Saccharose	Methionin	Adenosin
<u>Vitamine und Mineralien</u>	Glutathion	Dextran	Phenylalanin	Adeninsulfat
Ascorbinsäure	<u>Antibiotikum</u>	<u>Aminosäuren</u>	Serin	Desoxyribose
Aminobenzoesäure	Gentamicinsulfat	Arginin	Threonin	Ribose
Calciferol	<u>Energiesubstrate</u>	Glycin	Tryptophan	<u>Wasser</u>
Folsäure	Glukose	Histidin	Valin	Wasser für
Nikotinsäure	Inositol		Cystein	Injektionszwecke (WFI)

QUALITÄTSSICHERUNG

Die Membranfiltrierung und aseptische Verarbeitung der Lösungen im Vit Kit-Thaw erfolgt in Übereinstimmung mit validierten Fertigungsverfahren.

Jede Charge von Vit Kit-Thaw durchläuft folgende Tests:

Lösungen:

- Endotoxin durch Limulus-Amoebocyten-Lysat-Nachweis (LAL-Methode) ($\leq 0,6$ EU/ml)
- Mausembryo-Assay (einzellig) (≥ 80 % expandierte Blastozysten)
- Sterilität durch aktuellen USP-Sterilitätstest <71> (Bestanden)

Alle Ergebnisse sind einer chargenspezifischen Analysebescheinigung zu entnehmen, die auf Anfrage erhältlich ist.

ERWÄRMEN DES CRYOTIP ALS TRÄGER:

BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND:

- Verbindungsstück (Bestell.-Nr. 40736) oder Adapter
- Sterile Petrischalen (50 X 9 mm, Falcon 351006 oder gleichwertig)
- Einmalhandschuhe
- Hamilton GASTIGHT®-Spritze (50 µl), Bestell-Nr. 80901
- Transferpipetten (Pipetten aus gezogenem Glas oder Mikropipetten-Spitzen mit einem Innendurchmesser von ca. 200 µm)
- Pinzette
- Stoppuhr oder Zeitgeber
- Flüssigstickstoff-Vorratsbehälter (Dewar- oder Styroporbehälter mit Deckel, Volumen 1–2 l)
- Flüssigstickstoff (ausreichendes Volumen für eine Tiefe von ca. 4 Zoll (10 cm) im Vorratsbehälter)
- Scharfe Schere (steril)
- 37 °C warmes Wasserbad
- Proteinhaltiges Kulturmedium, vor dem Auftauprozess in einem CO₂-Inkubator auf 37 °C vorgewärmt
- 37 °C-Inkubator ohne CO₂ oder Heizgerät

GEBRAUCHSANWEISUNG

Vit Kit-Thaw Komponenten (pro Anwendung):

- 50 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS
- 1 Verbindungsstück

ERWÄRMUNGSPROTOKOLL

(FÜR OOZYTEN UND EMBRYOS):

- HINWEIS: Die Verfahren sind bei Raumtemperatur (20–27 °C) durchzuführen. KEINEN erwärmten Objektträger bei den folgenden Verfahren verwenden.
- VORSICHT: Die Proben während der Manipulation mit Auftauauflösungen so weit wie möglich vor Lichtexposition schützen.
- Die benötigte Menge an TS, DS und WS vor der Erwärmung der vitrifizierten Proben auf Raumtemperatur (20–27 °C) bringen.
HINWEIS: Es sollte vermieden werden, die Fläschchen mit der gesamten Menge an TS, DS und WS wiederholt auf Raumtemperatur zu bringen, wenn jeweils nur eine geringe Menge davon gebraucht wird. Es ist besser, nur die benötigte Menge zu entnehmen und die Fläschchen gleich nach der Entnahme wieder bei 2–8 °C kühl zu stellen.
 - Den Flüssigstickstoffbehälter mit Flüssigstickstoff (bis ca. 80 %) befüllen und neben dem LN₂-Gefrierschrank aufstellen, in dem sich die aufzutauenden Proben befinden.
 - Cryocanes mit Bechern und den darin befindlichen CryoTips mit den vitrifizierten Proben aus dem Flüssigstickstofftank nehmen und in den Flüssigstickstoffbehälter überführen.
VORSICHT: Zur Vermeidung eines unkontrollierten Auftaus der Proben sicherstellen, dass die CryoTips während des Transfers vom Tank in den LN₂-Behälter (im Becher) in LN₂ eingetaucht bleiben.
Zur schnellen Bearbeitung den Behälter neben das Mikroskop stellen.
 - Eine sterile Petrischale (bzw. den Deckel) mit den notwendigen Informationen beschriften.
 - Vor dem Gebrauch den Inhalt jedes Fläschchens mit TS, DS und WS durch zweimaliges vorsichtiges Umdrehen mischen.
 - Die Schale mit den Tröpfchen der Lösungen wie folgt für das Erwärmungsprotokoll vorbereiten:
Unter Einsatz einer aseptischen Technik eine Sequenz mit 2 Mikrotropfen auf den umgedrehten Deckel einer sterilen Petrischale geben, wie in Abbildung 1 dargestellt, und die Schale auf den Objektträger stellen:
 - Ein 50-µl-Tropfen TS
 - Ein 50-µl-Tropfen DS
 - (Zwei Tropfen WS werden später in Schritt 11 vorbereitet)
 - Das 37 °C warme Wasserbad neben das Mikroskop stellen. Folgendes griffbereit halten: eine Transferpipette und Spitzen, eine sterile scharfe Schere, eine Hamilton-Spritze sowie sterile Tücher.
 - Mit einer Pinzette (oder Zange) den gewünschten CryoTip aus dem Cryocane im Flüssigstickstoff herausnehmen, den CryoTip schnell in das 37 °C warme Wasserbad (≥ 500 ml) eintauchen und vorsichtig 3 Minuten lang schwenken, um ihn bei einer Aufwärmgeschwindigkeit von + 24.000 °C/Min. aufzuwärmen (siehe Abbildung 2).
 - Den Inhalt des CryoTip wie folgt schnell abgeben (siehe Abbildung 3):
 - Den CryoTip schnell mit einem sterilen Tuch trockenwischen.
 - Metallschutzhülle entfernen.
 - Die Versiegelung am breiten Ende des CryoTip an der Markierung Nr. 4 abschneiden.
 - Das breite Ende des CryoTip mit einem Verbindungsstück oder Adapter fest auf eine Hamilton-Spritze oder ein geeignetes Aspirationsinstrument setzen.
HINWEIS: Den Kolben der Spritze circa 0,5 Zoll (1,3 cm) nach oben ziehen, bevor die Spritze mit dem Verbindungsstück und dem CryoTip verbunden wird.
 - Die feine Spitze vorsichtig mit einem sterilen Tuch trockenwischen.
 - Den CryoTip über die vorbereitete Auftauschale halten und schnell die Versiegelung an der Markierung Nr. 2 am Ende mit der feinen Spitze abschneiden und den Inhalt des CryoTip als kleinen Tropfen (ca. 1 µl) auf einen trockenen Bereich der Schale oberhalb des TS-Tropfens abgeben (siehe Abbildung 4).
HINWEIS: BEI DER ABGABE DES INHALTS DIE BILDUNG VON LUFTBLASEN VERMEIDEN.
 - Den TS-Tropfen zum Inhalt des CryoTip geben und allmählich 1 Minute lang vermischen (siehe Abbildung 4).
Hinweis: Die Proben schrumpfen und steigen im Tropfen nach oben.
HINWEIS: Nach jedem Probentransfer alle verbleibenden Reste in der Transferpipette entleeren und vor der nächsten Bearbeitung etwas Lösung vom nächsten Tropfen aufziehen. Die Bildung von Luftblasen während des Transfers vermeiden.
 - Etwas DS in die Transferpipette aufziehen und die Probe(n) von dem TS-Tropfen für einen Zeitraum von 4 Minuten mit einem minimalen Volumen auf den DS-Tropfen überführen.
HINWEIS: Die Probe(n) bleibt (bleiben) während der Exposition in DS geschrumpft.
WÄHREND DIESER ZEIT DIE BEIDEN 50-µl-TROPFEN WS (WS1, WS2) WIE IN ABBILDUNG 4 DARGESTELLT VORBEREITEN.
 - Die Probe(n) 4 Minuten lang auf den WS-Tropfen (WS1) übertragen.
HINWEIS: Die Probe(n) sollte(n) innerhalb von 2–3 Minuten in WS wieder ihre ursprüngliche Größe annehmen.
 - Dann die Probe(n) 4 Minuten lang auf den zweiten WS-Tropfen (WS2) überführen.
 - Erwärmte OOZYTE(N) zur Wiederherstellung vor der weiteren Bearbeitung auf ein prä-äquilibriertes Kulturmedium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml (2–3 Stunden für Spindel-Neubildung) übertragen.
Es gibt zwei Optionen für erwärmte(n) EMBRYO(S):
 - Bei unverzüglichem Transfer in die Gebärmutter der Patientin: Den (die) EMBRYO(S) auf ein prä-äquilibriertes „Transfer“-Medium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml übertragen.
 - Für weitere Kultivierung: Den (die) EMBRYO(S) während einer 4-stündigen Wiederherstellungsphase auf ein prä-äquilibriertes Kulturmedium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml übertragen. Nach der Wiederherstellungsphase den (die) EMBRYO(S) auf ein Kulturmedium mit 10 % (v/v) Protein übertragen und eine Inkubation durchführen, bis das erwünschte Entwicklungsstadium für den Transfer in die Gebärmutter der Patientin erreicht ist.

ERWÄRMEN DES HSV STRAW ALS TRÄGER:

BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND:

- Sterile 4-Well-Schale (Nunc 179830, 144444 oder gleichwertig) oder Organkulturschale (BD Falcon 353037)
- Einmalhandschuhe
- Transferpipetten
- Pinzette
- Stoppuhr oder Zeitgeber
- Flüssigstickstoff-Vorratsbehälter
- Flüssigstickstoff

- Schere, Knipex oder einen anderen Drahtschneider
- Proteinhaltiges Kulturmedium, vor dem Auftauprozess in einem CO₂-Inkubator auf 37 °C vorgewärmt
- 37 °C-Inkubator ohne CO₂ oder Heizgerät

GEBRAUCHSANWEISUNG

Vit Kit-Thaw Komponenten (pro Anwendung):

- 250 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

ERWÄRMUNGSPROTOKOLL

(FÜR OOZYTEN UND EMBRYOS):

HINWEIS: Die Schritte zur Erwärmung der Proben umfassen das Eintauchen des Geräts in TS bei 37 °C und nachfolgendes Verdünnen und Waschen in DS und WS bei Raumtemperatur.

1. Aufwärmeschalen (wie im HSV-Instrumentenschaubild dargestellt) vorbereiten:
 - Bei 37 °C: Unter Einsatz einer aseptischen Technik 250 µl TS in eine sterile 4-Well-Schale oder eine Organkulturschale abgeben und mindestens 30 Minuten vor Start des Erwärmungsprozesses in einen 37 °C-Inkubator ohne CO₂ oder in ein Heizgerät stellen.
- HINWEIS: Für Oozyten mindestens 1 ml TS abgeben.
2. Den (die) zu erwärmenden HSV Straw(s) bestimmen und zur Vorbereitung auf den Erwärmungsprozess schnell vom LN₂-Behälter in einen mit LN₂ gefüllten Behälter überführen.
3. Zur anschließenden schnellen Bearbeitung den Behälter mit dem LN₂, neben das Mikroskop stellen.
4. Die TS-Schale aus dem 37 °C-Inkubator oder Heizgerät nehmen und unter den Fokus im oberen Bereich des Objektträgers stellen.
5. Den Straw so weit hochheben, dass der farbige Handhabungsstab sichtbar wird. Sicherstellen, dass das Ende mit der (den) Probe(n) in LN₂ eingetaucht bleibt.
6. Einen Knipex (oder einen anderen Drahtschneider) verwenden, um den Straw auf Höhe des farbigen Handhabungsstabs abzuschneiden. Die rote Schneidlängsführung am Knipex sollte auf die maximale Länge eingestellt sein oder entfernt werden.
 - Alternativ den Straw mit Finger und Daumen drehen und dabei 10 mm unter der Spitze des farbigen Handhabungsstabs Schneidbewegungen mit der Schere vornehmen.
7. Den Handhabungsstab mit einer zügigen aber kontrollierten Handbewegung schnell greifen und ihn aus dem Straw herausziehen.
8. Die Rinne unverzüglich in die 37 °C warme TS tauchen und leicht schwenken, um die Proben vom Instrument zu lösen; dann 1 Minute ruhen lassen.

Die Schritte 9–12 müssen bei Raumtemperatur (22–27 °C) durchgeführt werden.

- Bei Raumtemperatur: Unter Einsatz einer aseptischen Technik einen (1) 50-µl-Tropfen DS auf eine sterile Petrischale geben.

9. Etwas DS in die Transferpipette aufziehen und die Probe(n) von dem TS-Tropfen für einen Zeitraum von 4 Minuten mit einem minimalen Volumen auf den DS-Tropfen überführen.

HINWEIS: Die Probe(n) bleibt (bleiben) während der Exposition in DS geschrumpft.

WÄHREND DIESER ZEIT DIE BEIDEN 50-µl-TROPFEN WS (WS1, WS2) WIE IM HSV-INSTRUMENTENSCHAUBILD DARGESTELLT VORBEREITEN.

10. Die Probe(n) 4 Minuten lang auf den WS-Tropfen (WS1) übertragen.

HINWEIS: Die Probe(n) sollte(n) innerhalb von 2–3 Minuten in WS wieder ihre ursprüngliche Größe annehmen.
11. Dann die Probe(n) 4 Minuten lang auf den zweiten WS-Tropfen (WS2) überführen.
12. Erwärmte OOZYTE(N) zur Wiederherstellung vor der weiteren Bearbeitung auf ein prä-äquilibriertes Kulturmedium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml (2–3 Stunden für Spindel-Neubildung) übertragen.

Es gibt zwei Optionen für erwärmte(n) EMBRYO(S):

 - a) Bei unverzüglichem Transfer in die Gebärmutter der Patientin: Den (die) EMBRYO(S) auf ein prä-äquilibriertes „Transfer“-Medium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml übertragen.
 - b) Für weitere Kultivierung: Den (die) EMBRYO(S) während einer 4-stündigen Wiederherstellungsphase auf ein prä-äquilibriertes Kulturmedium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml übertragen. Nach der Wiederherstellungsphase den (die) EMBRYO(S) auf ein Kulturmedium mit 10 % (v/v) Protein übertragen und eine Inkubation durchführen, bis das erwünschte Entwicklungsstadium für den Transfer in die Gebärmutter der Patientin erreicht ist.

HINWEIS: Zur optimalen Fertilisation nach der Vitrifikation müssen wiederhergestellte Oozyten mit ICSI fertilisiert werden.

ERWÄRMEN DES CRYOLOCK™ ALS TRÄGER:

BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENHALTEN SIND:

- Sterile 4-Well-Schalen oder kleine sterile Petrischalen (35 X 10 mm oder gleichwertig)
- Einmalhandschuhe
- Transferpipetten
- Stoppuhr oder Zeitgeber
- Flüssigstickstoff-Vorratsbehälter
- Flüssigstickstoff
- Proteinhaltiges Kulturmedium, vor dem Auftauprozess in einem CO₂-Inkubator auf 37 °C vorgewärmt
- 37 °C-Inkubator ohne CO₂ oder Heizgerät
- Pinzette

GEBRAUCHSANWEISUNG

Vit Kit-Thaw Komponenten (pro Anwendung):

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

ERWÄRMUNGSPROTOKOLL

HINWEIS: Die Schritte zur Erwärmung der Proben umfassen das Eintauchen des Geräts in TS bei 37 °C und nachfolgendes Verdünnen und Waschen in DS und WS bei Raumtemperatur.

1. Vorbereitung der Auftauschale (wie im Cryolock-Schaubild in Abbildung 1 dargestellt):
 - Bei 37 °C: Unter Einsatz einer aseptischen Technik eine Mindestmenge von 1 ml TS abgeben und in einem Inkubator ohne CO₂ oder in einem Heizgerät mindestens 30 Minuten vor Start des Erwärmungsprozesses auf 37 °C erwärmen.

2. Die zu erwärmende(n) Cryolock-Probe(n) bestimmen und zur Vorbereitung auf den Erwärmungsprozess schnell vom LN₂-Lagerungsbehälter in einen mit LN₂ gefüllten Aufbewahrungsbehälter überführen.
 3. Den mit LN₂ gefüllten Aufbewahrungsbehälter in unmittelbarer Nähe zum Arbeitsbereich und Objektträger aufstellen, um anschließend einen schnelleren Transfer vom Behälter zur TS-Lösung sicherzustellen.
 4. Die TS-Schale aus dem 37 °C-Inkubator oder Heizgerät nehmen und unter den Fokus im oberen Bereich des Objektträgers stellen.
 5. Mit einer Pinzette das obere Ende des Cryolocks mit dem Kennzeichnungsetikett nach oben halten.
Option A: Schnell aber vorsichtig unter LN₂ die Kappe abnehmen; hierzu die Teile drehen, bis sie sich lösen.
Option B: Den Cryolock schnell aus dem LN₂ nehmen, dann schnell die Kappe durch leichtes Drehen abnehmen.
- HINWEIS: Jedes Labor sollte seine eigenen Verfahren und Protokolle einhalten. Die Anwendung von Option A ist in den USA nicht zugelassen.
6. Die konkave Spitze des Cryolocks unverzüglich mit der (den) Probe(n) nach oben in 37 °C warme TS eintauchen. Den Cryolock vorsichtig unter mikroskopischer Beobachtung bewegen, bis die Probe(n) sich von der Spitze gelöst hat (haben).
 7. Die Probe(n) insgesamt 1 Minute lang in der TS belassen.
 8. Dreißig (30) Sekunden nach dem ersten Eintauchen ggf. in der Lösung schwebende(n) Probe(n) vorsichtig pipettieren und zum Boden der TS-Lösung bringen.
- Die Schritte 9–12 müssen bei Raumtemperatur (22–27 °C) durchgeführt werden.
- Bei Raumtemperatur: Unter Einsatz einer aseptischen Technik einen (1) 50-µl-Tropfen DS auf eine sterile Petrischale geben (siehe Cryolock-Schaubild, Abbildung 2).
9. Die Probe(n) für einen Zeitraum von 4 Minuten auf DS überführen. Die Proben einmal vorsichtig pipettieren, um sicherzustellen, dass sie vollständig in DS gespült werden.
- HINWEIS: Die Probe(n) bleibt (bleiben) während der Exposition in DS geschrumpft.
10. Während der 4-minütigen Expositionszeit in DS unter Einsatz einer aseptischen Technik zwei (2) 50-µl-Tropfen WS (WS1, WS2) dispensieren, wie im Schaubild dargestellt.
 11. Die Probe(n) jeweils 4 Minuten lang im ungestörten Zustand auf WS1 und dann auf WS2 überführen.
 12. Die Probe(n) sollte(n) innerhalb von 2–3 Minuten in WS wieder ihre ursprüngliche Größe annehmen.
- Erwärmte Oozyte(n) zur Wiederherstellung vor der weiteren Bearbeitung auf ein prä-äquilibriertes Kulturmedium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml (2–3 Stunden für Spindel-Neubildung) übertragen.

Es gibt zwei Optionen für erwärmte(n) EMBRYO(S):

- a) Bei unverzüglichem Transfer in die Gebärmutter der Patientin: Den (die) EMBRYO(S) auf ein prä-äquilibriertes „Transfer“-Medium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml übertragen.
- b) Für weitere Kultivierung: Den (die) EMBRYO(S) während einer 4-stündigen Wiederherstellungsphase auf ein prä-äquilibriertes Kulturmedium mit 20 % (v/v) Proteinzusatz oder 12 mg/ml übertragen. Nach der Wiederherstellungsphase den (die) EMBRYO(S) auf ein Kulturmedium mit 10 % (v/v) Protein übertragen und eine Inkubation durchführen, bis das erwünschte Entwicklungsstadium für den Transfer in die Gebärmutter der Patientin erreicht ist.

Weitere Einzelheiten zum Gebrauch dieser Produkte sind den Verfahren und Vorschriften des jeweiligen Labors zu entnehmen, die eigens für das jeweilige medizinische Programm entwickelt und optimiert wurden.

LAGERUNGSANWEISUNGEN UND STABILITÄT

Die ungeöffneten Flaschen bei 2 °C bis 8 °C gekühlt lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Lösungen des Vitrifikations-Auftauchs bis zu dem auf der Kennzeichnung der Flaschen angegebenen Verfallsdatum stabil.

Die Medien nach Öffnen der Behälter nicht länger als acht (8) Wochen verwenden.

Da menschliches Ausgangsmaterial im Produkt vorhanden ist, können sich während der Lagerung sichtbare Partikel bilden. Diese Partikel haben keinen nachweislichen Einfluss auf die Produktleistung.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Dieses Produkt ist für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in assistierten Reproduktionsverfahren geschult ist. Zu diesen Verfahren zählt der Anwendungsbereich, für den dieses Produkt vorgesehen ist.

Die Einrichtung des Anwenders ist für die Rückverfolgbarkeit des Produkts verantwortlich und muss alle einschlägigen geltenden Bestimmungen zur Rückverfolgbarkeit einhalten.

Flaschen mit Lösung, die Schäden oder Leckagen aufweisen, sichtbare Partikel enthalten, getrübt sind oder deren Farbe verändert ist, nicht verwenden. Das Produkt gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgen.

Um Kontaminationsprobleme zu vermeiden, bei der Handhabung immer aseptische Techniken einsetzen.

Aus der aktuellen Forschungsliteratur geht hervor, dass die Langzeitwirkungen der Vitrifikation auf Oozyten und Embryos immer noch unbekannt sind.

Keine Flaschen verwenden, deren Sterilverpackung beschädigt wurde.

EU: Zu den Standardmaßnahmen zur Prävention von Infektionen infolge der Verwendung von Arzneimitteln, die aus menschlichem Blut oder Plasma hergestellt sind, gehören die Auswahl der Spender, die Untersuchung der einzelnen Blutspenden und der Plasmapools hinsichtlich spezifischer Infektionsmarker und die Durchführung wirksamer Schritte während der Herstellung zur Inaktivierung/Entfernung von Viren. Dessen ungeachtet kann die Möglichkeit der Übertragung infektiöser Erreger bei Verarbeitung von Arzneimitteln, die aus menschlichem Blut oder Plasma hergestellt sind, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies gilt auch für unbekannte oder neu auftretende Viren und sonstige Pathogene. Es liegen keine Berichte über bestätigte Virusübertragungen mit Albumin vor, das nach den Spezifikationen des Europäischen Arzneibuchs mit etablierten Verfahren hergestellt wurde. Es wird dringend empfohlen, dass bei jeder Verwendung eines Reproduktionsmediums von Irvine Scientific, LLC für Patienten der Name und die Chargenbezeichnung des Produktes protokolliert werden, um nachverfolgen zu können, welche Produktcharge bei welchem Patienten angewendet wurde.

USA: Dieses Produkt enthält Humanalbumin (HSA). Für die Herstellung dieses Produkts verwendetes Material menschlichen Ursprungs wurde mit von der FDA zugelassenen Testkits geprüft und erwies sich als nicht reaktiv im Hinblick auf Antikörper gegen Hepatitis C (HCV) und Antikörper gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV). Kein Testverfahren kann jedoch mit vollständiger Sicherheit ausschließen, dass Produkte menschlichen Ursprungs infektiös sind. Alle Materialien menschlichen Ursprungs sind unter Einhaltung der universellen Vorsichtsmaßnahmen so zu handhaben, als ob sie eine Infektion übertragen könnten. Spender der Ausgangsmaterialien wurden auch auf Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) überprüft.

KONTRAINDIKATIONEN

Das Produkt enthält Gentamicinsulfat. Es ist anhand angemessener Vorsichtsmaßnahmen sicherzustellen, dass der Patient keine Sensitivität gegenüber diesem Antibiotikum aufweist.

AVVERTENZA PER L'UE: solo per uso professionale.

INDICAZIONI PER L'USO

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) è destinato all'uso nello scongelamento di ovociti (MII), zigoti pronucleati (PN), embrioni nella fase di clivaggio al giorno 3 ed embrioni allo stadio di blastocisti, vitrificati con il Vitrification Freeze Kit (cod. cat. 90133-SO).

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

Thawing Solution-TS è una soluzione tamponata con HEPES di Medium-199 contenente gentamicina solfato, 1,0 M di saccarosio e 20% (v/v) di Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS è una soluzione tamponata con HEPES di Medium-199 contenente gentamicina solfato, 0,5 M di saccarosio e 20% (v/v) di DSS.

Washing Solution-WS è una soluzione tamponata con HEPES di Medium-199 contenente gentamicina solfato e 20% (v/v) di DSS.

Il DSS è un integratore proteico costituito da 50 mg/ml di albumina sierica umana (HSA) di classe terapeutica e 20 mg/ml di destrano. Viene usato al 20% (v/v) in Vit Kit-Thaw per una concentrazione finale di 10 mg/ml di HSA e di 4 mg/ml di destrano.

Queste tre soluzioni sono formulate per essere usate in sequenza in base al protocollo di riscaldamento graduale in microgoccia.

COMPOSIZIONE

<u>Sali e ioni</u>	<u>Ammide di acido</u>	<u>Fonte di proteine</u>	<u>Prolina</u>	<u>Altro</u>
Cloruro di sodio	nicotinico	Albumina sierica umana	Tirosina	Guanina
Fosfato di sodio	Acido pantotenico	<u>Tamponi</u>	Alanina	Ipoantina
Cloruro di potassio	Riboflavina	Bicarbonato di sodio	Acido aspartico	Timina
Solfato di magnesio	Piridossina	HEPES	Acido glutammico	Uracile
Acetato di sodio	Tiamina	<u>Indicatore di pH</u>	Isoleucina	Xantina
Cloruro di calcio	Biotina	Rosso fenolo	Leucina	Adenosina
Nitrato ferrico	Alfa-tocoferolo	<u>Macromolecole</u>	Metionina	Solfato di adenina
Cloruro di colina	Bisolfato di sodio	Saccarosio	Fenilalanina	Desossiribosio
<u>Vitamine e minerali</u>	<u>Antiossidante</u>	Destrano	Serina	Ribosio
Acido ascorbico	Glutazione	<u>Aminoacidi</u>	Treonina	<u>Acqua</u>
Acido aminobenzoico	<u>Antibiotico</u>	Arginina	Triptofano	Qualità WFI (Acqua
Calciferolo	Gentamicina solfato	Glicina	Valina	per iniezioni)
Acido folico	<u>Substrati energetici</u>	Istidina	Cisteina	
Acido nicotinico	Glucosio	Lisina	Idrossiprolina	
	Inositolo		Cistina	

GARANZIA DI QUALITÀ

Le soluzioni di Vit Kit-Thaw sono filtrate su membrana e preparate in asepsi mediante processi di produzione convalidati.

Tutti i lotti di Vit Kit-Thaw sono sottoposti ai seguenti test.

Soluzioni

Endotossine, mediante saggio del lisato di amebociti di Limulus (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Saggio su embrioni unicellulari di topo (con $\geq 80\%$ di blastocisti espanse)

Sterilità, mediante l'attuale test apposito USP <71> (esito positivo)

Tutti i risultati sono riportati in un Certificato di analisi specifico per ogni lotto, disponibile su richiesta.

RISCALDAMENTO DEL CRYOTIP COME PORTATORE

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

- Connettore (n. di catalogo 40736) o adattatore
- Piastre di Petri sterili (50 x 9 mm, Falcon 351006 o equivalenti)
- Guanti monouso
- Siringa Hamilton GASTIGHT® (50 µl) n. di catalogo 80901
- Pipette di trasferimento (pipette in vetro tirato o puntali per micropipetta con diametro interno del puntale di 200 µm circa)
- Pinzette
- Cronometro o timer
- Serbatoio contenente azoto liquido (contenitore dewar o in polistirolo con coperchio, volume di 1-2 litri)
- Azoto liquido (volume sufficiente per ottenere una profondità di 4 pollici [10 cm] nel serbatoio)
- Forbici affilate (sterili)
- Bagno d'acqua a 37 °C
- Terreno di coltura con integratore proteico, pre-equilibrato a 37 °C in un incubatore a CO₂ prima della procedura di scongelamento
- Incubatore senza CO₂ o piastra riscaldante a 37 °C

ISTRUZIONI PER L'USO

Componenti di Vit Kit-Thaw (per applicazione):

- 50 µl di soluzione di scongelamento – TS
- 50 µl di soluzione di diluizione – DS
- 100 µl di soluzione di lavaggio – WS
- 1 connettore

PROTOCOLLO DI RISCALDAMENTO

(PER OVOCITI ED EMBRIONI)

NOTA – Le procedure devono essere eseguite a temperatura ambiente (20-27 °C). Per le seguenti procedure, NON usare un tavolino traslatore del microscopio riscaldato.

ATTENZIONE – Ridurre al minimo l'esposizione del campione alla luce durante le manipolazioni nelle soluzioni di scongelamento.

1. Prima di riscaldare i campioni vitrificati, portare a temperatura ambiente (20-27 °C) la quantità di TS, DS e WS necessaria.
NOTA – Evitare di portare ripetutamente a temperatura ambiente interi flaconi di TS, DS e WS se si deve utilizzare ogni volta solo una piccola quantità di soluzione. È preferibile prelevare la quantità da utilizzare e rimettere immediatamente i flaconi in frigorifero a 2-8 °C.

2. Riempire il serbatoio di azoto liquido (pieno per circa l'80%) e porlo in prossimità del congelatore a LN₂ contenente i campioni da scongelare.

3. Estrarre i CryoCane con i goblet contenenti i CryoTip con i campioni vitrificati dal congelatore di conservazione in azoto liquido e trasferirli nel serbatoio riempito con azoto liquido.

ATTENZIONE – Accertarsi che i CryoTip rimangano sommersi in LN₂ (nel goblet) durante il trasferimento dal congelatore al serbatoio di LN₂, per prevenire lo scongelamento incontrollato dei campioni.

Porre il serbatoio vicino al microscopio ai fini di una manipolazione rapida.

4. Etichettare una piastra di Petri (o coperchio) sterile con le informazioni necessarie.
5. Prima dell'uso, capovolgere delicatamente due volte i flaconi di TS, DS e WS per mescolarne il contenuto.
6. Preparare la piastra con gocce delle soluzioni per il protocollo di riscaldamento, come segue:
Dispensare con tecnica asettica una sequenza di 2 microgocce sul coperchio capovolto di una piastra di Petri sterile, come mostrato nella Figura 1, e posizionare la piastra sul tavolino del microscopio:

- una goccia da 50 µl di TS;
- una goccia da 50 µl di DS;
- (due gocce di WS saranno preparate più avanti al punto 11).

7. Porre il bagno d'acqua a 37 °C vicino al microscopio. Tenere a portata di mano una pipetta di trasferimento e puntali, forbici affilate sterili, siringa Hamilton e salviette sterili.

8. Usando le pinzette (o delle pinze), recuperare il CryoTip specifico dal CryoCane in azoto liquido, immergerlo rapidamente nel bagno d'acqua a 37 °C (≥ 500 ml) e farlo roteare delicatamente per 3 secondi per riscaldarlo (vedere Figura 2) a +24.000 °C/min.

9. Dispensare rapidamente il contenuto del CryoTip come segue (vedere Figura 3):

- Asciugare rapidamente il CryoTip con una salvietta sterile
- Rimuovere la guaina metallica di copertura
- Tagliare il sigillo sull'estremità larga del CryoTip in corrispondenza del segno n. 4
- Fissare bene l'estremità larga del CryoTip alla siringa Hamilton o al dispositivo di aspirazione adatto mediante un connettore o un adattatore.

NOTA – Prima di collegare la siringa al connettore e al CryoTip, sollevarne lo stantuffo di circa 0,5 pollici (1,3 cm).

- Asciugare delicatamente la punta sottile con una salvietta sterile.
- Tenendo il CryoTip al di sopra della piastra di scongelamento preparata, tagliare rapidamente il sigillo in corrispondenza del segno n. 2 sull'estremità della punta sottile e dispensare il contenuto del CryoTip sotto forma di gocciolina (circa 1 µl) in una zona asciutta della piastra al di sopra della goccia di TS (vedere la Figura 4).

NOTA – EVITARE LA FORMAZIONE DI BOLLE DURANTE LA DISPENSAZIONE DEL CONTENUTO.

10. Unire la goccia di TS al contenuto del CryoTip e attendere la miscelazione graduale per 1 minuto (vedere la Figura 4).

Nota – I campioni si contrarranno e galleggeranno sulla superficie della goccia.

NOTA – Dopo ciascun trasferimento di campioni, espellere eventuale liquido rimasto nella pipetta di trasferimento e aspirare un po' di soluzione dalla goccia successiva prima della manipolazione seguente. Evitare la formazione di bolle durante il trasferimento.

11. Aspirare un po' di DS nella pipetta di trasferimento e trasferire i campioni con un volume minimo di soluzione dalla goccia di TS alla goccia di DS per 4 minuti.

NOTA – Durante l'esposizione alla DS, il campione rimane contratto.

NELL'ATTESA, PREPARARE LE DUE GOCCE DA 50 µl DI WS (WS1, WS2), COME MOSTRATO NELLA FIGURA 4.

12. Trasferire i campioni nella goccia di WS (WS1) per 4 minuti.

NOTA – Nella WS, i campioni devono espandersi nuovamente alle dimensioni originali entro 2-3 minuti.

13. Trasferire i campioni nella seconda goccia di WS (WS2) per 4 minuti.

14. Prima delle manipolazioni successive, gli OVOCITI devono essere trasferiti in terreno di coltura pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml per il recupero (2-3 ore per consentire la riformazione del fuso).

Per gli EMBRIONI riscaldati esistono due opzioni:

- a) Per il trasferimento immediato alla paziente: trasferire gli EMBRIONI nel mezzo di "trasferimento" pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml.

- b) Per l'ulteriore coltura: trasferire gli embrioni nel terreno di coltura pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml per un periodo di recupero di 4 ore. Dopo il periodo di recupero, trasferire gli EMBRIONI in un terreno di coltura con contenuto proteico del 10% (v/v) e incubarli opportunamente fino a raggiungere lo stadio di sviluppo desiderato per il trasferimento alla paziente.

RISCALDAMENTO DEL DISPOSITIVO HSV COME PORTATORE

MATERIALE NECESSARIO MA NON IN DOTAZIONE

- Piastra sterile a 4 pozzetti (Nunc 179830, 144444 o equivalente) OPPURE piastra di coltura di organi (BD Falcon 353037)

- Guanti monouso

- Pipette di trasferimento

- Pinzette

- Cronometro o timer

- Serbatoio contenente azoto liquido

- Azoto liquido

- Forbici, Knipex o un altro strumento per tagliare fili metallici

- Terreno di coltura con integratore proteico, pre-equilibrato a 37 °C in un incubatore a CO₂ prima della procedura di scongelamento

- Incubatore senza CO₂ o piastra riscaldante a 37 °C

ISTRUZIONI PER L'USO

Componenti di Vit Kit-Thaw (per applicazione):

- 250 µl di soluzione di scongelamento – TS
- 50 µl di soluzione di diluizione – DS
- 100 µl di soluzione di lavaggio – WS

PROTOCOLLO DI RISCALDAMENTO

(PER OVOCITI ED EMBRIONI)

NOTA – Le operazioni di riscaldamento includono l'immersione del dispositivo in TS a 37 °C, e la diluizione e il lavaggio successivi in DS e WS a temperatura ambiente

1. Preparare le piastre di riscaldamento (come mostrato nel diagramma del dispositivo HSV):
 - A 37 °C: dispensare con tecnica asettica 250 µl di TS in una piastra sterile a 4 pozzetti o una piastra per coltura di organi e porla in un incubatore a 37 °C senza CO₂ o su una piastra riscaldante almeno 30 minuti prima della procedura di riscaldamento.
- NOTA – Per gli ovociti, dispensare almeno 1 ml di TS.
2. Identificare le pailette HSV da riscaldare dal contenitore di conservazione con LN₂ e trasferirle rapidamente al serbatoio riempito con LN₂ in preparazione alla procedura di scongelamento.
3. Porre il serbatoio con LN₂ vicino al microscopio per la successiva manipolazione rapida.
4. Rimuovere la piastra di TS dall'incubatore o dalla piastra riscaldante a 37 °C e metterla a fuoco dopo averla collocata sul tavolino traslatore del microscopio.
5. Sollevare la pailette a sufficienza da esporre l'asta di manipolazione colorata. Accertarsi che l'estremità con i campioni resti immersa in LN₂.
6. Usare un Knipex (o un altro strumento per tagliare i fili metallici) per tagliare la pailette all'altezza dell'asta di manipolazione colorata. La guida della lunghezza di taglio rossa sul Knipex deve essere regolata sulla lunghezza massima o rimossa.
 - In alternativa, far girare la pailette tra il pollice e le altre dita mentre si eseguono dei movimenti di taglio con le forbici, 10 mm sotto l'asta di manipolazione colorata.
7. Con un solo movimento, rapido ma controllato, afferrare velocemente l'asta di manipolazione ed estrarla dalla pailette.
8. Immergere immediatamente il canale in TS a 37 °C, farlo roteare delicatamente per staccare i campioni dal dispositivo e attendere 1 minuto.

I passaggi da 9 a 12 devono essere eseguiti a temperatura ambiente (22-27 °C).

- A temperatura ambiente: dispensare con tecnica asettica una (1) goccia da 50 µl di DS su una piastra di Petri sterile.
9. Aspirare un po' di DS nella pipetta di trasferimento e trasferire i campioni con un volume minimo di soluzione dalla goccia di TS a quella di DS per 4 minuti.

NOTA – Durante l'esposizione alla DS, il campione rimane contratto.

NELL'ATTESA, PREPARARE LE DUE GOCCE DA 50 µl DI WS (WS1, WS2), COME MOSTRATO NEL DIAGRAMMA DEL DISPOSITIVO HSV.
 10. Trasferire i campioni nella goccia di WS (WS1) per 4 minuti.

NOTA – Nella WS, i campioni devono espandersi nuovamente alle dimensioni originali entro 2-3 minuti.
 11. Trasferire i campioni nella seconda goccia di WS (WS2) per 4 minuti.
 12. Prima delle manipolazioni successive, gli OVOCITI devono essere trasferiti in terreno di coltura pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml per il recupero (2-3 ore per consentire la riformazione del fuso).

Per gli EMBRIONI riscaldati esistono due opzioni:

 - a) Per il trasferimento immediato alla paziente: trasferire gli EMBRIONI nel mezzo di "trasferimento" pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml.
 - b) Per l'ulteriore coltura: trasferire gli embrioni nel terreno di coltura pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml per un periodo di recupero di 4 ore. Dopo il periodo di recupero, trasferire gli EMBRIONI in un terreno di coltura con contenuto proteico del 10% (v/v) e incubarli opportunamente fino a raggiungere lo stadio di sviluppo desiderato per il trasferimento alla paziente.

NOTA – Per ottenere risultati ottimali dopo la vitrificazione, gli ovociti recuperati devono essere fecondati con ICSI.

RISCALDAMENTO DEL CRYOLOCK™ COME PORTATORE

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

- Piastra sterile a 4 pozzetti o piastre di Petri sterili piccole (35 x 10 mm o equivalenti)
- Guanti monouso
- Pipette di trasferimento
- Cronometro o timer
- Serbatoio contenente azoto liquido
- Azoto liquido
- Terreno di coltura con integratore proteico, pre-equilibrato a 37 °C in un incubatore a CO₂ prima della procedura di scongelamento
- Incubatore senza CO₂ o piastra riscaldante a 37 °C
- Pinza

ISTRUZIONI PER L'USO

Componenti di Vit Kit-Thaw (per applicazione):

- 1 µl di soluzione di scongelamento – TS
- 50 µl di soluzione di diluizione – DS
- 100 µl di soluzione di lavaggio – WS

PROTOCOLLO DI RISCALDAMENTO

NOTA – Le operazioni di riscaldamento includono l'immersione del dispositivo in TS a 37 °C, e la diluizione e il lavaggio successivi in DS e WS a temperatura ambiente

1. Preparare la piastra di scongelamento (come mostrato nel diagramma del Cryolock, Figura 1):
 - A 37 °C: almeno 30 minuti prima dell'inizio della procedura di riscaldamento, dispensare in modo asettico un volume minimo di 1 ml di TS e riscaldarlo a 37 °C in un incubatore senza CO₂ o su una piastra riscaldante.
2. In preparazione alla procedura di riscaldamento, identificare i campioni Cryolock da riscaldare e trasferirli velocemente dal contenitore di conservazione con LN₂ a un serbatoio di raccolta pieno di LN₂.

3. Collocare quest'ultimo serbatoio vicino all'area di lavoro e al tavolino traslatore del microscopio per consentire il successivo trasferimento rapido dal serbatoio stesso alla TS.
4. Rimuovere la piastra di TS dall'incubatore o dalla piastra riscaldante a 37 °C e metterla a fuoco dopo averla collocata sul tavolino traslatore del microscopio.
5. Con una pinza, tenere l'estremità superiore del corpo del Cryolock con l'etichetta di identificazione rivolta verso l'alto.
Opzione A: togliere rapidamente ma delicatamente il tappo sotto il contenitore di LN₂, girando le parti fino al distacco.
Opzione B: estrarre rapidamente il Cryolock dal contenitore di LN₂, quindi togliere rapidamente il tappo girandolo delicatamente.

NOTA – Attenersi alle procedure e ai protocolli previsti dal laboratorio di appartenenza. L'opzione A non è stata approvata per l'uso negli USA.

6. Immergere immediatamente la punta concava del Cryolock, con i campioni rivolti verso l'alto, nella TS a 37 °C. Sotto osservazione al microscopio, muovere delicatamente il Cryolock finché i campioni non vengono rilasciati dalla punta.
7. Lasciare i campioni nella TS per 1 minuto in totale.
8. A trenta (30) secondi dall'immersione iniziale, se i campioni galleggiano sulla soluzione, pipettarli delicatamente per affondarli.

I passaggi da 9 a 12 devono essere eseguiti a temperatura ambiente (22-27 °C).

- A temperatura ambiente: dispensare con tecnica asettica una (1) goccia da 50 µl di DS su una piastra di Petri sterile (vedere il diagramma del Cryolock, Figura 2).

9. Trasferire il campione o i campioni alla DS per 4 minuti. Pipettare delicatamente i campioni una volta per garantirne il completo risciacquo nella DS.

NOTA – Durante l'esposizione alla DS, il campione rimane contratto.

10. Durante i 4 minuti di esposizione alla DS, dispensare in modo asettico due (2) gocce da 50 µl di WS (WS1, WS2) come mostrato nel diagramma.

11. Trasferire il campione o i campioni alla WS1 e successivamente alla WS2 per 4 minuti in ciascun caso, lasciandoli riposare.

NOTA – Nella WS, i campioni devono espandersi nuovamente alle dimensioni originali entro 2-3 minuti.

12. Prima delle manipolazioni successive, gli OVOCITI devono essere trasferiti in terreno di coltura pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml per il recupero (2-3 ore per consentire la riformazione del fuso).

Per gli EMBRIONI riscaldati esistono due opzioni:

- a) Per il trasferimento immediato alla paziente: trasferire gli EMBRIONI nel mezzo di "trasferimento" pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml.
- b) Per l'ulteriore coltura: trasferire gli embrioni nel terreno di coltura pre-equilibrato con integratore proteico al 20% (v/v) o 12 mg/ml per un periodo di recupero di 4 ore. Dopo il periodo di recupero, trasferire gli EMBRIONI in un terreno di coltura con contenuto proteico del 10% (v/v) e incubarli opportunamente fino a raggiungere lo stadio di sviluppo desiderato per il trasferimento alla paziente.

Per ulteriori dettagli sull'uso di questi prodotti, il laboratorio deve consultare le procedure e i protocolli specificamente sviluppati e ottimizzati per il proprio programma medico.

ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare le fiale non aperte in frigorifero a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Se conservate secondo le istruzioni, le soluzioni del Vitrification Thaw Kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta dei flaconi.

Non utilizzare i terreni per oltre otto (8) settimane dall'apertura dei contenitori.

Il prodotto contiene materiale di origine umana; è quindi possibile assistere alla formazione di particolato in fase di conservazione. Questo particolato non ha alcun effetto noto sulle prestazioni del prodotto.

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale debitamente addestrato alle tecniche di riproduzione assistita. Queste tecniche includono l'applicazione prevista del prodotto.

La struttura che utilizza questo prodotto è responsabile del mantenimento della sua rintracciabilità e, ove applicabile, deve agire in ottemperanza alle norme di legge sulla rintracciabilità.

Non utilizzare flaconi di soluzione con evidenti danni, perdite, particolato, torbidità o variazioni di colore. Smaltire il prodotto ai sensi delle norme applicabili.

Per evitare problemi di contaminazione, maneggiare il prodotto utilizzando tecniche asettiche.

Ad oggi, secondo la letteratura scientifica, gli effetti a lungo termine della vitrificazione sugli ovociti e sugli embrioni rimangono sconosciuti.

Non usare flaconi la cui confezione sterile sia stata compromessa.

UE: le misure standard per la prevenzione delle infezioni derivanti dall'utilizzo di prodotti medicinali preparati con sangue o plasma umano includono la selezione dei donatori, lo screening delle singole donazioni e dei pool di plasma per il rilevamento di specifici marcatori di infezione, e l'inclusione di fasi della produzione efficaci ai fini dell'inattivazione e dell'eliminazione dei virus. Nonostante ciò, con la somministrazione di un prodotto medicinale preparato da plasma o sangue umano, non è possibile escludere in modo assoluto la possibilità di trasmissione di agenti infettivi. Ciò vale anche per virus e altri patogeni sconosciuti o emergenti. Non sono stati segnalati casi confermati di trasmissione di virus derivanti dall'utilizzo di albumina prodotta secondo le specifiche della Farmacopea europea con procedimenti stabili. Si consiglia vivamente di registrare il nome e il numero di lotto di qualsiasi terreno di coltura per tecniche di riproduzione assistita di Irvine Scientific, LLC somministrato a una paziente al fine di mantenere l'associazione tra la stessa e il lotto del prodotto.

USA: questo prodotto contiene albumina sierica umana (HSA). Il materiale di origine umana usato nella produzione di questo prodotto è stato analizzato mediante test autorizzati dalla FDA ed è risultato non reattivo agli anticorpi del virus dell'epatite C (HCV) e del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Tuttavia, nessuno degli attuali metodi di analisi è in grado di garantire in modo assoluto che i prodotti derivati da materiale umano non siano infettivi. Trattare tutti i materiali di origine umana come potenzialmente in grado di trasmettere infezioni, adottando le precauzioni universali. I donatori di materiale umano sono stati sottoposti anche a screening per la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ).

CONTROINDICAZIONI

Il prodotto contiene gentamicina solfato. Adottare le opportune precauzioni per assicurarsi che la paziente non presenti sensibilità a questo antibiotico.

ADVERTENCIA PARA LA UE: Para uso exclusivamente por parte de profesionales.

INDICACIÓN DE USO

El Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) se ha diseñado para la descongelación de los ovocitos vitrificados (MI), cigotos pronucleares (PN) hasta embriones en el estadio de división del día 3 y embriones en el estadio de blastocisto que se hayan vitrificado con el Vitrification Freeze Kit (n.º de catálogo 90133-SO).

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

La **Thawing Solution-TS** es una solución tamponada de HEPES del Medium-199 que contiene sulfato de gentamicina, sacarosa 1,0 M y 20 % (v/v) del Dextran Serum Supplement (DSS).

La **Dilution Solution-DS** es una solución tamponada de HEPES del Medium-199 que contiene sulfato de gentamicina, sacarosa 0,5 M y 20 % (v/v) del DSS.

La **Washing Solution-WS** es una solución tamponada de HEPES del Medium-199 que contiene sulfato de gentamicina y 20 % (v/v) del DSS.

El DSS es un suplemento proteico compuesto por 50 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) de calidad terapéutica y 20 mg/ml de dextrano. El DSS se utiliza al 20 % (v/v) en Vit Kit-Thaw, es decir, con una concentración final de HSA de 10 mg/ml y de dextrano de 4 mg/ml.

Estas tres soluciones se deben utilizar de manera secuencial de acuerdo con el protocolo de calentamiento en microgotas por etapas.

COMPOSICIÓN

<u>Salas e iones</u>	Amida del ácido nicotínico	<u>Fuente de proteína</u>	Prolina	<u>Otro</u>
Cloruro sódico	Albúmina sérica humana	Tirosina	Guanina	Hipoxantina
Fosfato sódico	Ácido pantoténico	<u>Sistemas tampón</u>	Alanina	Timina
Cloruro potásico	Riboflavina	Bicarbonato sódico	Ácido aspártico	Uracilo
Sulfato de magnesio	Piridoxina	HEPES	Ácido glutámico	Xantina
Acetato sódico	Tiamina	<u>Indicador del pH</u>	Isoleucina	Adenosina
Cloruro cálcico	Biotina	Rojo de fenol	Leucina	Sulfato de adenina
Nitrato férrico	Alfa-tocoferol	<u>Macromoléculas</u>	Metionina	Desoxirribosa
Cloruro de colina	Bisulfito de sodio	Sacarosa	Fenilalanina	Ribosa
<u>Vitaminas y minerales</u>	<u>Antioxidante</u>	Dextrano	Serina	<u>Agua</u>
Ácido ascórbico	Glutación	<u>Aminoácidos</u>	Treonina	Calidad de agua para inyectables
Ácido aminobenzoico	<u>Antibiótico</u>	Arginina	Triptófano	
Calciferol	Sulfato de gentamicina	Glicina	Valina	
Ácido fólico	<u>Fuentes de energía</u>	Histidina	Cisteína	
Ácido nicotínico	Glucosa	Lisina	Hidroxiprolina	
	Inositol		Cistina	

CONTROL DE CALIDAD

Las soluciones de Vit Kit-Thaw se filtran a través de membranas y se procesan en condiciones asépticas conforme a procesos de fabricación validados.

Cada lote de Vit Kit-Thaw se somete a los ensayos siguientes:

Soluciones:

- Endotoxinas, por el método LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*) ($\leq 0,6$ UE/ml)
- Ensayo de embriones de ratón (estadio de una célula) (≥ 80 % de blastocistos expandidos)
- Esterilidad, por el vigente ensayo <71> «Sterility Test» de la USP (supera el ensayo)

Todos los resultados están descritos en el certificado de análisis específico de cada lote, el cual puede obtenerse previa petición.

PARA CALENTAR EL CRYOTIP COMO MEDIO DE TRANSPORTE:

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Conector (n.º de catálogo 40736) o adaptador
- Placas de Petri estériles (50 × 9 mm, Falcon 351006 o equivalente)
- Guantes desechables
- Jeringa de Hamilton GASTIGHT® (50 µl, n.º de catálogo 80901)
- Pipetas de transferencia (pipetas de vidrio estiradas o puntas de micropipeta que tengan un diámetro interno de ~200 µm)
- Pinzas
- Cronómetro o temporizador
- Depósito de nitrógeno líquido (vaso Dewar o de espuma de poliestireno con tapa, volumen 1-2 l)
- Nitrógeno líquido (volumen suficiente para llenar el depósito con una profundidad de 4 in [10 cm])
- Tijeras afiladas (estériles)
- Baño de agua a 37 °C
- Medio de cultivo con proteínas, preequilibrado a 37 °C en una incubadora de CO₂ antes del procedimiento de descongelación
- Incubadora de 37 °C sin CO₂ o platina de calentamiento

INSTRUCCIONES DE USO

Componentes de Vit Kit-Thaw (por aplicación):

- 50 µl de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS
- 1 conector

PROTOCOLO DE CALENTAMIENTO

(PARA OVOCITOS Y EMBRIONES):

- NOTA: Los procedimientos deben realizarse a temperatura ambiente (20-27 °C). NO utilice la platina caliente del microscopio en los procedimientos siguientes.
- PRECAUCIÓN: Minimice la exposición de la muestra a la luz durante las manipulaciones con las soluciones de descongelación.
- Lleve a temperatura ambiente (20-27 °C) la cantidad de TS, DS y WS que desee utilizar antes de calentar las muestras vitrificadas. NOTA: Procure no llevar de forma reiterada a temperatura ambiente los viales enteros de TS, DS y WS cada vez que necesite una pequeña cantidad de la solución. Es preferible repartir en alícuotas la cantidad que se desee utilizar y volver a llevar los viales a 2-8 °C inmediatamente después.
 - Llene de nitrógeno líquido el depósito correspondiente (~80 %) y colóquelo cerca del congelador de N₂L que contenga las muestras que desee descongelar.
 - Saque del congelador de nitrógeno líquido las cañas con las copas que contengan los CryoTips con las muestras vitrificadas y transfíralas al depósito lleno de nitrógeno líquido. PRECAUCIÓN: Asegúrese de que los CryoTips permanezcan sumergidos en el N₂L (en la copa) durante la transferencia desde el congelador hasta el depósito de N₂L para evitar una descongelación incontrolada de las muestras. Coloque el depósito cerca del microscopio para agilizar su manipulación.
 - Etiquete cada placa de Petri estéril (o tapa) con la información necesaria.
 - Invierta con suavidad dos veces cada vial de TS, DS y WS para mezclar su contenido antes de usarlo.
 - Prepare la placa con gotas de las soluciones para el protocolo de calentamiento de la siguiente manera:
Dispense de manera aseptica y secuencial 2 microgotas sobre una tapa invertida de una placa de Petri estéril según se muestra en la figura 1, y coloque la placa en la platina del microscopio:
 - Una gota de 50 µl de TS
 - Una gota de 50 µl de DS
 - (Más adelante, en el paso 11 se dispensarán dos gotas de WS)
 - Coloque el baño de agua a 37 °C cerca del microscopio. Tenga a mano lo siguiente: una pipeta de transferencia y puntas, tijeras afiladas estériles, una jeringa de Hamilton y toallitas estériles.
 - Con unas pinzas, recupere el CryoTip específico de la caña en nitrógeno líquido, sumérjalo enseguida en el baño de agua a 37 °C (≥500 ml) y balanceelo con suavidad durante 3 segundos para calentarlo (véase la figura 2) a +24.000 °C/min.
 - Dispense rápidamente el contenido del CryoTip tal como se indica a continuación (véase la figura 3):
 - Seque rápidamente el CryoTip con una toallita estéril.
 - Quite la funda metálica protectora.
 - Corte el sello del extremo ancho del CryoTip por la marca 4.
 - Adhiera de manera segura con un conector o adaptador el extremo ancho del CryoTip a la jeringa de Hamilton o al utensilio pertinente de aspiración.
 - NOTA: Levante el émbolo de la jeringa 0,5 in (1,3 cm) antes de conectar la jeringa al conector y al CryoTip.
 - Seque suavemente la punta fina con una toallita estéril
 - Con el CryoTip colocado sobre la placa de descongelación preparada, corte enseguida el sello por la marca 2 del extremo de la punta fina y dispense el contenido del CryoTip en forma de una pequeña gota (~1 µl) en una región seca de la placa por encima de la gota de TS (véase la figura 4).
 - NOTA: PROCURE QUE NO SE FORMEN BURBUJAS AL DISPENSAR EL CONTENIDO.
 - Fusione la gota de TS con el contenido del CryoTip y deje que se mezclen de forma gradual durante 1 minuto (véase la figura 4).
Nota: Las muestras se encogerán y flotarán hacia la parte superior de la gota.
NOTA: Después de cada transferencia de la(s) muestra(s), elimine mediante soplo el líquido residual de la pipeta de transferencia y aspire parte de la solución de la siguiente gota antes de la siguiente manipulación. Procure que no se formen burbujas durante las transferencias.
 - Aspire un poco de DS en la pipeta de transferencia y transfiera la(s) muestra(s) de la gota de TS con un volumen mínimo a la gota de DS durante 4 minutos.
NOTA: La muestra se encogerá durante la exposición a la DS.
DURANTE ESTE TIEMPO, PREPARE LAS DOS GOTAS DE 50 µl de WS (WS1, WS2) TAL COMO SE MUESTRA EN LA FIGURA 4.
 - Transfiera la(s) muestra(s) a la gota de WS (WS1) durante 4 minutos.
NOTA: La(s) muestra(s) se volverá(n) a expandir hasta el tamaño original en 2-3 minutos en WS.
 - Luego, transfiera la(s) muestra(s) a la segunda gota de WS (WS2) durante 4 minutos.
 - Antes de las manipulaciones posteriores, transfiera el OVOCITO u OVOCITOS calentados al medio de cultivo preequilibrado con 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml para su recuperación (2-3 horas para que dé tiempo a que se forme de nuevo el huso). Existen dos opciones con el EMBRIÓN u EMBRIONES calentados:
 - Transferencia inmediata a la paciente: transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES a un medio de «transferencia» preequilibrado que contenga 20 % de suplemento proteico (v/v) o 12 mg/ml.
 - Cultivo adicional: transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES a un medio de cultivo preequilibrado que contenga 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml durante un período de recuperación de 4 horas. Después del período de recuperación, transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES al medio de cultivo con 10 % (v/v) de proteínas e incube de la manera conveniente hasta alcanza la etapa de desarrollo deseada para su transferencia a la paciente.

PARA CALENTAR EL DISPOSITIVO DE HSV COMO MEDIO DE TRANSPORTE:

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Placa estéril de 4 pocillos (Nunc 179830, 144444 o equivalente) o placa para cultivo de órganos (BD Falcon 353037)
- Guantes desechables
- Pipetas de transferencia
- Pinzas
- Cronómetro o temporizador
- Depósito de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido
- Tijeras, alicates u otra herramienta para cortar alambre

- Medio de cultivo con proteínas, preequilibrado a 37 °C en una incubadora de CO₂ antes del procedimiento de descongelación
- Incubadora de 37 °C sin CO₂ o platina de calentamiento

INSTRUCCIONES DE USO

Componentes de Vit Kit-Thaw (por aplicación):

- 250 µl de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS

PROTOCOLO DE CALENTAMIENTO

(PARA OVOCITOS Y EMBRIONES):

NOTA: Los pasos de calentamiento consisten en sumergir el dispositivo en TS a 37 °C y luego diluirlo y lavarlo en DS y WS a temperatura ambiente.

1. Prepare las placas de calentamiento (como se muestra en el diagrama del dispositivo HSV):
 - A 37 °C: dispense de manera aséptica 250 µl de TS en una placa estéril de 4 pocillos o en una placa de cultivo de órganos y colóquela en una incubadora de 37 °C sin CO₂ o en una platina de calentamiento durante al menos 30 minutos antes del procedimiento de calentamiento.
2. NOTA: Para los ovocitos, dispense como mínimo 1 ml de TS.
3. Identifique en el congelador de N₂L la(s) pajuela(s) de HSV que desee calentar y transfírela(s) rápidamente al depósito lleno de N₂L como preparación para el procedimiento de descongelación.
4. Coloque el depósito de N₂L cerca del microscopio para agilizar la manipulación posteriormente.
5. Retire la placa de TS de la incubadora de 37 °C o de la platina de calentamiento y enfoque la placa (sobre la platina del microscopio).
6. Levante la pajuela lo suficiente para exponer la varita de manipulación con código de color. Cerciórese de que el extremo con la(s) muestra(s) permanezca sumergido en N₂L.
7. Use unos alicates (u otra herramienta similar) para cortar la pajuela a la altura de la varita de manipulación. La guía roja de longitud de corte de los alicates se colocará en la posición de máxima longitud o bien se retirará.
 - Otra alternativa es girar la pajuela entre el pulgar y los demás dedos mientras efectúa los movimientos de corte con las tijeras, 10 mm por debajo de la parte superior de la varita de manipulación.
8. Con un movimiento rápido pero controlado, agarre la varita de manipulación y sáquela de la pajuela.
9. Sumerja de inmediato el surco en la TS a 37 °C y balancéelo para despegar las muestras del dispositivo y déjelo durante 1 minuto. Los pasos 9-12 se realizarán a temperatura ambiente (22-27 °C).

- A temperatura ambiente: Dispense de manera aséptica una (1) gota de 50 µl de DS en una placa de Petri estéril.

9. Aspire un poco de DS en la pipeta de transferencia y transfiera la(s) muestra(s) de la gota de TS con un volumen mínimo a la gota de DS durante 4 minutos.

NOTA: La muestra se encogerá durante la exposición a la DS.

DURANTE ESTE TIEMPO, PREPARE LAS DOS GOTAS DE 50 µl DE WS (WS1, WS2) TAL COMO SE MUESTRA EN EL DIAGRAMA DEL DISPOSITIVO DE HSV.

10. Transfiera la(s) muestra(s) a la gota de WS (WS1) durante 4 minutos.

NOTA: La(s) muestra(s) se volverá(n) a expandir hasta el tamaño original en 2-3 minutos en WS.
11. Luego, transfiera la(s) muestra(s) a la segunda gota de WS (WS2) durante 4 minutos.
12. Transfiera el OVOCITO u OVOCITOS calentados al medio de cultivo preequilibrado con 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml para su recuperación (2-3 horas para que dé tiempo a que se forme de nuevo el huso) antes de las manipulaciones posteriores. Existen dos opciones con el EMBRIÓN u EMBRIONES calentados:
 - a) Transferencia inmediata a la paciente: transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES a un medio de «transferencia» preequilibrado que contenga 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml.
 - b) Cultivo adicional: transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES a un medio de cultivo preequilibrado que contenga 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml durante un período de recuperación de 4 horas. Después del período de recuperación, transfiera el EMBRIÓN U EMBRIONES al medio de cultivo con 10 % (v/v) de proteínas e incube de la manera conveniente hasta alcanzar la etapa de desarrollo deseada para su transferencia a la paciente.

NOTA: Los ovocitos recuperados se fecundarán mediante ICSI para obtener una fertilización óptima después de la vitrificación.

PARA CALENTAR EL CRYOLOCK™ COMO MEDIO DE TRANSPORTE:

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Placa estéril de 4 pocillos o pequeñas placas de Petri estériles (35 × 10 mm o equivalente)
- Guantes desechables
- Pipetas de transferencia
- Cronómetro o temporizador
- Depósito de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido
- Medio de cultivo con proteínas, preequilibrado a 37 °C en una incubadora de CO₂ antes del procedimiento de descongelación
- Incubadora de 37 °C sin CO₂ o platina de calentamiento
- Pinzas

INSTRUCCIONES DE USO

Componentes de Vit Kit-Thaw (por aplicación):

- 1 ml de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS

PROTOCOLO DE CALENTAMIENTO

NOTA: Los pasos de calentamiento consisten en sumergir el dispositivo en TS a 37 °C y luego diluirlo y lavarlo en DS y WS a temperatura ambiente.

1. Configure la placa de descongelación (como se muestra en diagrama de Cryolock de la figura 1):
 - A 37 °C: Dispense de manera aséptica un volumen mínimo de 1 ml de TS y caliéntela a 37 °C en una incubadora sin CO₂ o en una platina de calentamiento durante al menos 30 minutos antes de iniciar el procedimiento de calentamiento.

- Identifique el dispositivo o dispositivos que tengan la(s) muestra(s) que desee calentar y transfíralos enseguida del congelador de N₂L a un depósito de retención lleno de N₂L como paso previo al procedimiento de calentamiento.
- Coloque el depósito de retención lleno de N₂L en las proximidades del área de trabajo y de la platina del microscopio para agilizar su manipulación y transferencia del depósito a la TS.
- Retire la placa de TS de la incubadora de 37 °C o de la platina de calentamiento y enfoque la placa (sobre la platina del microscopio).
- Sostenga con las pinzas el extremo superior del cuerpo del Cryolock (la etiqueta de identificación debe mirar hacia arriba).
Opción A: Quite con rapidez pero con suavidad la tapa sumergida en el N₂L girando las piezas hasta que se suelten.
Opción B: Saque enseguida el Cryolock del N₂L y luego quite rápidamente la tapa con un giro suave.

NOTA: El laboratorio deberá consultar sus propios procedimientos y protocolos. La opción A no está autorizada en Estados Unidos.

- Sumerja de inmediato la punta cóncava del Cryolock, con la(s) muestra(s) mirando hacia arriba, en la TS a 37 °C. Observando con el microscopio, mueva suavemente el Cryolock hasta que se libere(n) la(s) muestra(s) de la punta.
- Deje la(s) muestra(s) en la TS durante 1 minuto en total.
- Treinta (30) segundos después de la inmersión inicial, pipetee con suavidad la(s) muestra(s) si está(n) flotando y colóquela(s) en el fondo de la TS.

Los pasos 9-12 se realizarán a temperatura ambiente (22-27 °C).

- A temperatura ambiente: Dispense de manera aséptica una (1) gota de 50 µl de DS en una placa de Petri estéril (véase el diagrama de Cryolock en la figura 2).

- Transfiera la(s) muestra(s) a DS durante 4 minutos. Con cuidado, pipetee las muestras una vez para su enjuague completo en DS.

NOTA: La muestra se encogerá durante la exposición a la DS.

- Durante los 4 minutos de exposición a DS, dispense de manera aséptica dos (2) gotas de 50 µl de WS (WS1, WS2) como se muestra en el diagrama.

- Transfiera la(s) muestra(s) a WS1 y luego a WS2 durante 4 minutos cada vez, sin alterarla(s).

NOTA: La(s) muestra(s) se volverá(n) a expandir hasta el tamaño original en 2-3 minutos en WS.

- Transfiera el OVOCITO u OVOCITOS calentados al medio de cultivo preequilibrado con 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml para su recuperación (2-3 horas para que dé tiempo a que se forme de nuevo el huso) antes de las manipulaciones posteriores.

Existen dos opciones con el EMBRIÓN u EMBRIONES calentados:

- Transferencia inmediata a la paciente: transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES a un medio de «transferencia» preequilibrado que contenga 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml.
- Cultivo adicional: transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES a un medio de cultivo preequilibrado que contenga 20 % (v/v) de suplemento proteico o 12 mg/ml durante un período de recuperación de 4 horas. Después del período de recuperación, transfiera el EMBRIÓN u EMBRIONES al medio de cultivo con 10 % (v/v) de proteínas e incube de la manera conveniente hasta alcanzar la etapa de desarrollo deseada para su transferencia a la paciente.

Para más detalles sobre la utilización de estos productos, consultar los protocolos y los procedimientos de su propio laboratorio, que se habrán desarrollado y optimizado específicamente de acuerdo con su programa médico particular.

INSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar los viales sin abrir en el frigorífico a una temperatura entre 2 y 8 °C. Si se conservan según las instrucciones, las soluciones del Vitrification Thaw Kit mantienen su estabilidad hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas de los viales.

Una vez abiertos los envases, no utilice los medios durante más de ocho (8) semanas.

Como el producto contiene material de origen humano, puede aparecer alguna partícula durante su conservación. Este tipo de partículas no tiene ningún efecto conocido en el rendimiento del producto.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Este producto está destinado a su uso por parte de personal con formación en procedimientos de reproducción asistida. Entre estos procedimientos se incluye la aplicación para la que se ha diseñado el dispositivo.

El centro donde se utilice este producto tiene la responsabilidad de mantener la trazabilidad del producto y debe cumplir la normativa nacional sobre trazabilidad, según corresponda.

No utilice ningún vial de solución con indicios de daños, fugas, partículas, turbidez o cambio de color. Desechar el producto de acuerdo con la reglamentación pertinente.

Para evitar problemas de contaminación, manipular con técnicas asépticas.

En la actualidad, la bibliografía empírica revela que se siguen desconociendo los efectos a largo plazo de la vitrificación sobre los ovocitos y los embriones.

No utilice frascos cuyo envase estéril esté dañado.

UE: entre las medidas estándar para la prevención de infecciones derivadas del uso de productos medicinales elaborados a partir de sangre y plasma humanos cabe mencionar, entre otras, la selección de donantes, la evaluación de donaciones individuales y de reservas de plasma para la identificación de marcadores específicos de infección y la inclusión de procedimientos de elaboración eficaces para la inactivación o eliminación de virus. A pesar de lo anterior, al administrar productos médicos elaborados a partir de sangre o plasma humanos, no se puede descartar por completo la posibilidad de transmisión de agentes infecciosos. Esta advertencia cabe aplicarla también a virus desconocidos o emergentes y a otros patógenos. No se ha informado de ninguna transmisión comprobada de virus con albúmina elaborada según las especificaciones de la Farmacopea Europea mediante procesos establecidos. Se recomienda encarecidamente que, cada vez que se administre a una paciente un medio de cultivo perteneciente a los productos para la reproducción de Irvine Scientific, LLC, se registren el nombre y el número de lote del producto con la finalidad de mantener un registro de la relación entre la paciente y el lote del producto.

EE. UU.: este producto contiene albúmina sérica humana (HSA). El material de origen humano utilizado en la preparación de este producto ha sido testado con kits aprobados por la FDA de EE. UU. y se ha determinado que dicho material no es reactivo a los anticuerpos de la hepatitis C (VHC) ni a los anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ningún método analítico ofrece garantías absolutas de que los productos de origen humano no sean infecciosos. Se aconseja manipular todos los materiales de origen humano como si fueran susceptibles de transmitir infecciones. Para ello, se deben tomar precauciones de carácter universal. Los donantes también fueron sometidos a análisis de detección de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

CONTRAINDICACIÓN

El producto contiene sulfato de gentamicina. Es conveniente adoptar las medidas necesarias para asegurarse de que la paciente no sea sensible a este antibiótico.

MISE EN GARDE (UE) : réservé à un usage professionnel.

INDICATION

Le Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) est conçu pour servir à la décongélation des ovocytes (MI), des zygotes pronucléaires (PN), des embryons du premier au treizième jour du stade de segmentation et des embryons au stade blastocyste, qui ont été vitrifiés à l'aide du Vitrification Freeze Kit (réf. 90133-SO).

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

La **Thawing Solution-TS** est une solution de milieu 199 tamponnée à l'HEPES contenant du sulfate de gentamicine, 1,0 M de saccharose et 20 % (v/v) de DSS (Dextran Serum Supplement).

La **Dilution Solution-DS** est une solution de milieu 199 tamponnée à l'HEPES contenant du sulfate de gentamicine, 0,5 M de saccharose et 20 % (v/v) de DSS.

La **Washing Solution-WS** est une solution de milieu 199 tamponnée à l'HEPES contenant du sulfate de gentamicine et 20 % (v/v) de DSS.

Le DSS est un supplément protéique constitué de 50 mg/ml d'albumine sérique humaine (HSA) de qualité thérapeutique et de 20 mg/ml de dextrane. Le DSS est utilisé à 20 % (v/v) dans le Vit Kit-Thaw avec une concentration finale de 10 mg/ml de HSA et 4 mg/ml de dextrane.

Ces trois solutions doivent être utilisées successivement selon les étapes du protocole de réchauffement en microgouttes.

COMPOSITION

Sels et ions

Chlorure de sodium
Phosphate de sodium
Chlorure de potassium
Sulfate de magnésium
Acétate de sodium
Chlorure de calcium
Nitrate ferrique
Chlorure de choline

Vitamines et minéraux

Acide ascorbique
Acide aminobenzoïque
Calciférol
Acide folique
Acide nicotinique

Nicotinamide (amide de l'acide nicotinique)
Acide pantothénique
Riboflavine
Pyridoxine
Thiamine
Biotine
Alpha tocophérol
Bisulfite de sodium

Antioxydant

Glutathion

Antibiotique

Sulfate de gentamicine

Substrats énergétiques

Glucose
Inositol

Source protéique

Albumine sérique humaine

Tampons

Bicarbonate de sodium
HEPES

Indicateur de pH

Rouge de phénol

Macromolécules

Saccharose
Dextrane

Acides aminés

Arginine
Glycine
Histidine
Lysine

Proline
Tyrosine
Alanine
Acide aspartique
Acide glutamique
Isoleucine
Leucine
Méthionine
Phénylalanine
Sérine
Thréonine
Tryptophane
Valine
Cystéine
Hydroxyproline
Cystine

Autre

Guanine
Hypoxanthine
Thymine
Uracile
Xanthine
Adénosine
Sulfate d'adénine
Désoxyribose
Ribose

Eau

Qualité WFI

ASSURANCE QUALITÉ

Les solutions contenues dans le Vit Kit-Thaw sont stérilisées par filtration et conditionnées de façon aseptique conformément aux procédures de fabrication préalablement validées.

Chaque lot de Vit Kit-Thaw subit les tests suivants :

Solutions :

Teneur en endotoxines évaluée par la méthode LAL (lysate d'améboocytes de limule) ($\leq 0,6$ UE/ml)

Test sur embryon de souris (une cellule) (taux de blastocystes expansés ≥ 80 %)

Stérilité vérifiée par le test de stérilité actuel de la pharmacopée américaine (USP) <71> (stérilité confirmée)

Les résultats de ces tests sont disponibles dans un certificat d'analyses spécifique à chaque lot et mis à disposition sur demande.

POUR RÉCHAUFFER UN CRYOTIP CONTENANT UN SPÉCIMEN :

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON INCLUS

- Raccord (réf. 40736) ou adaptateur
- Boîtes de Pétri stériles (50 x 9 mm, Falcon 351006 ou modèle équivalent)
- Gants jetables
- Seringue Hamilton GASTIGHT® (50 µl) réf. 80901
- Pipettes de transfert (pipettes en verre tiré ou cônes de micropipette d'un diamètre intérieur d'environ 200 µm)
- Pinces
- Chronomètre ou minuterie
- Réservoir d'azote liquide (Dewar ou polystyrène avec couvercle, 1 à 2 l)
- Azote liquide (volume suffisant pour obtenir une profondeur de 10 cm [4 po] dans le réservoir)
- Ciseaux coupants (stériles)
- Bain-marie à 37 °C
- Milieu de culture supplémenté en protéines, pré-équilibré à 37 °C dans un incubateur à CO₂ avant la procédure de décongélation
- Incubateur à 37 °C sans CO₂ ou platine chauffante

MODE D'EMPLOI

Composants du Vit Kit-Thaw (par application) :

- 50 µl de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS
- 1 raccord

PROTOCOLE DE RÉCHAUFFEMENT

(POUR LES OVOCYTES ET LES EMBRYONS) :

REMARQUE : les procédures doivent se faire à température ambiante (entre 20 et 27 °C). NE PAS utiliser de platine de microscope chauffante pour les procédures suivantes.

MISE EN GARDE : minimiser l'exposition des spécimens à la lumière pendant les manipulations dans les solutions de décongélation. Préparer les volumes de solutions TS, DS et WS à utiliser et les laisser s'équilibrer à température ambiante (entre 20 et 27 °C) avant de procéder au réchauffement des spécimens vitrifiés.

REMARQUE : éviter de mettre les tubes entiers de solutions TS, DS et WS à température ambiante à plusieurs reprises si seulement une portion de la solution est nécessaire pour chaque décongélation. Il est préférable de prélever la quantité à utiliser et de conserver les tubes entre 2 et 8 °C après l'aliquotage.

- Remplir le réservoir d'azote liquide avec de l'azote liquide (environ 80 % de sa capacité) et le placer à côté du système de stockage à azote liquide contenant les spécimens à décongeler.

- Sortir les cannes de gobelets contenant les CryoTips avec les spécimens vitrifiés du système de stockage à azote liquide et les transférer dans le réservoir rempli d'azote liquide.

MISE EN GARDE : s'assurer que les CryoTips demeurent immergés dans l'azote liquide (dans le gobelet) durant le transfert du système de stockage au réservoir d'azote liquide afin d'éviter la décongélation incontrôlée des spécimens.

Placer le réservoir près du microscope pour une manipulation rapide.

- Étiqueter chaque boîte de Pétri (ou couvercle) stérile en indiquant les informations nécessaires.
- Retourner délicatement deux fois chaque tube de solutions TS, DS et WS pour en mélanger le contenu avant l'utilisation.
- Préparer une boîte de Pétri avec des gouttelettes des solutions nécessaires pour le protocole de réchauffement, comme suit : Déposer de façon aseptique une série de deux gouttes sur le couvercle retourné d'une boîte de Pétri stérile, comme illustré à la figure 1, puis placer le couvercle sur la platine du microscope :

- une goutte de 50 µl de solution TS
- une goutte de 50 µl de solution DS
- (Deux gouttes de solution de lavage WS seront déposées ultérieurement lors de l'étape 11)

- Placer le bain-marie réglé à 37 °C près du microscope. Placer également les articles suivants à portée de main : une pipette de transfert et des cônes, des ciseaux coupants stériles, une seringue Hamilton et des lingettes en papier stériles.

- À l'aide des pinces, sortir le CryoTip souhaité de la canne immergée dans l'azote liquide, le plonger rapidement dans le bain-marie à 37 °C (≥ 500 ml) et l'y tourner délicatement pendant 3 secondes pour le réchauffer (voir figure 2) à +24 000 °C/min.

- Extraire rapidement le contenu du CryoTip comme suit (voir la figure 3) :

- Sécher le CryoTip en l'essuyant rapidement avec une lingette stérile.
- Retirer le manchon métallique.
- Couper la soudure sur l'extrémité large du CryoTip au repère n° 4.
- Raccorder solidement l'extrémité large du CryoTip à la seringue Hamilton ou à un dispositif d'aspiration approprié à l'aide d'un raccord ou d'un adaptateur.

REMARQUE : tirer le piston de la seringue d'approximativement 0,5 po (1,30 cm) avant de raccorder la seringue au raccord et au CryoTip.

- Sécher l'extrémité fine du CryoTip en l'essuyant délicatement avec une lingette stérile.
- Maintenir le CryoTip au-dessus du couvercle de décongélation déjà préparé, couper rapidement la soudure au niveau du repère n° 2 de l'extrémité fine du CryoTip et déposer le contenu de ce dernier sous forme d'une petite goutte (environ 1 µl) dans une zone sèche du couvercle au-dessus de la goutte de solution TS (voir figure 4).

REMARQUE : ÉVITER DE FORMER DES BULLES LORS DU DÉPÔT DU CONTENU DU CRYOTIP.

- Faire fusionner la gouttelette de solution TS avec le contenu du CryoTip, et les laisser se mélanger graduellement pendant 1 minute (voir figure 4).

Remarque : les spécimens vont rétrécir et se mettre à flotter à la surface de la goutte.

REMARQUE : après chaque transfert de spécimen, expulser complètement le contenu de la pipette de transfert et aspirer un peu de solution de la goutte suivante avant la manipulation à venir. Éviter de former des bulles lors des transferts.

- Aspirer un peu de solution DS dans la pipette de transfert et transférer le ou les spécimens, avec un minimum de volume, de la goutte TS à la goutte DS pendant 4 minutes.

REMARQUE : les spécimens demeurent rétrécis pendant l'exposition à la solution DS.

PENDANT CE TEMPS, PRÉPARER LES DEUX GOUTTES DE 50 µl DE SOLUTION DE LAVAGE WS (WS1, WS2), TEL QU'ILLUSTRE SUR LA FIGURE 4.

- Transférer le ou les spécimens dans la première goutte de solution WS (WS1) et laisser reposer pendant 4 minutes.

REMARQUE : les spécimens doivent retrouver leur taille initiale au bout de 2 à 3 minutes d'incubation dans la solution WS.

- Transférer le ou les spécimens dans la deuxième goutte de solution WS (WS2) et laisser reposer pendant 4 minutes.

- Transférer le ou les OVOCYTES réchauffés dans un milieu de culture pré-équilibré avec 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique pour la période de rétablissement (2 à 3 heures afin de permettre au fuseau méiotique de se reformer) avant toute manipulation ultérieure.

Les EMBRYONS réchauffés peuvent être utilisés de deux façons :

- a) Pour un transfert immédiat à la patiente : transférer les EMBRYONS dans un milieu de « transfert » pré-équilibré contenant 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique.

- b) Pour poursuivre la culture : transférer les EMBRYONS dans un milieu de culture pré-équilibré contenant 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique pour une période de rétablissement de 4 heures. Après la période de rétablissement, transférer les EMBRYONS dans un milieu de culture contenant 10 % (v/v) de protéines et les incuber de façon appropriée jusqu'à ce que le stade de développement désiré soit atteint pour le transfert à la patiente.

POUR RÉCHAUFFER UNE PAILLETTE HSV CONTENANT UN SPÉCIMEN :

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON INCLUS

- Boîte de culture stérile à quatre puits (Nunc 179830, 144444 ou équivalent), ou boîte de culture d'organes (BD Falcon 353037)
- Gants jetables
- Pipettes de transfert
- Pinces
- Chronomètre ou minuterie
- Réservoir d'azote liquide
- Azote liquide
- Ciseaux, pince coupante Knipex ou autre outil coupe-fils

- Milieu de culture supplémenté en protéines, pré-équilibré à 37 °C dans un incubateur à CO₂ avant la procédure de décongélation
- Incubateur à 37 °C sans CO₂ ou platine chauffante

MODE D'EMPLOI

Composants du Vit Kit-Thaw (par application) :

- 250 µl de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS

PROTOCOLE DE RÉCHAUFFEMENT

(POUR LES OVOCYTES ET LES EMBRYONS) :

REMARQUE : les étapes de réchauffement comprennent l'immersion du dispositif dans de la solution TS à 37 °C, puis la dilution et le lavage dans les solutions DS et WS à température ambiante.

1. Préparer les boîtes de décongélation (tel qu'illustré sur le schéma Paillette HSV) :

- À 37 °C : verser aseptiquement 250 µl de solution TS dans une boîte de culture à quatre puits ou une boîte de culture d'organes, puis placer la boîte dans un incubateur à 37 °C sans CO₂ ou sur une platine chauffante au moins 30 minutes avant la procédure de réchauffement.

REMARQUE : pour les ovocytes, verser au moins 1 ml de solution TS.

2. Repérer la ou les paillettes HSV à décongeler dans le système de stockage en azote liquide et les transférer rapidement dans le réservoir d'azote liquide en vue de la procédure de décongélation.
3. Placer le réservoir d'azote liquide près du microscope pour une manipulation rapide.
4. Retirer la paillette contenant la solution TS de l'incubateur à 37 °C ou de la platine chauffante, la placer sur la platine porte-objet du microscope, puis faire la mise au point sur la boîte.
5. Relever un peu la paillette pour exposer le jonc de préhension coloré. Prendre soin de maintenir l'extrémité contenant le ou les spécimens immergée dans l'azote liquide.
6. Utiliser une pince coupante Knipex (ou un autre outil coupe-fils) pour couper la paillette à la hauteur du jonc de préhension coloré. L'indicateur rouge de longueur de coupe de la pince Knipex doit être placé en position de longueur maximale ou bien retiré.
 - Il est aussi possible de faire tourner la paillette sur elle-même avec l'index et le pouce tout en effectuant des mouvements de découpage avec les ciseaux, à 10 mm en dessous du haut du jonc de préhension coloré.
7. D'un mouvement rapide mais assuré, saisir sans attendre le jonc de préhension et l'extraire de la paillette.
8. Plonger immédiatement la gouttière du capillaire dans la solution TS à 37 °C, remuer délicatement pour que les spécimens se détachent, puis attendre 1 minute.

Les étapes 9 à 12 doivent être effectuées à température ambiante (entre 22 et 27 °C).

- À température ambiante : déposer de façon aseptique une (1) goutte de 50 µl de solution DS dans une boîte de Pétri stérile.

9. Aspirer un peu de solution DS dans la pipette de transfert et transférer le ou les spécimens, avec un minimum de volume, de la goutte TS à la goutte DS pendant 4 minutes.

REMARQUE : les spécimens demeurent rétrécis pendant l'exposition à la solution DS.

PENDANT CE TEMPS, PRÉPARER LES DEUX GOUTTES DE 50 µl DE SOLUTION DE LAVAGE WS (WS1, WS2), TEL QU'ILLUSTRÉ SUR SCHEMA PAILLETTE HSV.

10. Transférer le ou les spécimens dans la première goutte de solution WS (WS1) et laisser reposer pendant 4 minutes.

REMARQUE : les spécimens doivent retrouver leur taille initiale au bout de 2 à 3 minutes d'incubation dans la solution WS.

11. Transférer le ou les spécimens dans la deuxième goutte de solution WS (WS2) et laisser reposer pendant 4 minutes.
12. Transférer le ou les OVOCYTES réchauffés dans un milieu de culture pré-équilibré avec 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique pour la période de rétablissement (2 à 3 heures afin de permettre au fuseau méiotique de se reformer) avant toute manipulation ultérieure.

Les EMBRYONS réchauffés peuvent être utilisés de deux façons :

- a) Pour un transfert immédiat à la patiente : transférer les EMBRYONS dans un milieu de « transfert » pré-équilibré contenant 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique.
- b) Pour poursuivre la culture : transférer les EMBRYONS dans un milieu de culture pré-équilibré contenant 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique pour une période de rétablissement de 4 heures. Après la période de rétablissement, transférer les EMBRYONS dans un milieu de culture contenant 10 % (v/v) de protéines et les incubé de façon appropriée jusqu'à ce que le stade de développement désiré soit atteint pour le transfert à la patiente.

REMARQUE : les ovocytes rétablis doivent être fécondés par ICSI pour un résultat optimal après vitrification.

POUR RÉCHAUFFER UN CRYOLOCK™ CONTENANT UN SPÉCIMEN :

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON INCLUS

- Boîte à 4 puits stérile ou petites boîtes de Pétri stériles (35 x 10 mm ou équivalent)
- Gants jetables
- Pipettes de transfert
- Chronomètre ou minuterie
- Réservoir d'azote liquide
- Azote liquide
- Milieu de culture supplémenté en protéines, pré-équilibré à 37 °C dans un incubateur à CO₂ avant la procédure de décongélation
- Incubateur à 37 °C sans CO₂ ou platine chauffante
- Pince

MODE D'EMPLOI

Composants du Vit Kit-Thaw (par application) :

- 1 ml de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS

PROTOCOLE DE RÉCHAUFFEMENT

REMARQUE : les étapes de réchauffement comprennent l'immersion du dispositif dans de la solution TS à 37 °C, puis la dilution et le lavage dans les solutions DS et WS à température ambiante.

1. Préparer la boîte de décongélation (comme illustré sur le schéma Cryolock, figure 1) :

- À 37 °C : déposer de façon aseptique au moins 1 ml de solution TS dans une boîte, puis la placer dans un incubateur à 37 °C sans CO₂ ou sur une platine chauffante, au moins 30 minutes avant la procédure de réchauffement.

- Repérer le ou les Cryolocks à réchauffer dans le système de stockage en LN₂ et les transférer rapidement dans le réservoir de LN₂ en vue de la procédure de réchauffement.
- Placer le réservoir rempli de LN₂ à proximité immédiate de la surface de travail et de la platine du microscope afin d'être en mesure de transférer rapidement les spécimens du réservoir à la boîte contenant la solution TS.
- Retirer la boîte contenant la solution TS de l'incubateur à 37 °C ou de la platine chauffante, la placer sur la platine porte-objet du microscope, puis faire la mise au point sur la boîte.
- Utiliser la pince pour saisir l'extrémité supérieure du Cryolock, avec l'étiquette d'identification orientée vers le haut.
 - Option A : retirer rapidement mais délicatement le capuchon dans le LN₂, en faisant tourner les pièces jusqu'à les séparer.
 - Option B : Sortir rapidement le Cryolock du LN₂, puis retirer rapidement le capuchon en le faisant délicatement tourner.

REMARQUE : le laboratoire doit consulter ses propres procédures et protocoles. L'utilisation de l'option A n'est pas autorisée aux États-Unis.

- Plonger immédiatement dans la solution TS à 37 °C la pointe concave du Cryolock avec les spécimens orientés vers le haut. Sous contrôle microscopique, agiter délicatement le Cryolock jusqu'à ce que les spécimens se détachent de la pointe.
 - Laisser les spécimens pendant une (1) minute complète dans la solution TS.
 - Trente (30) secondes après l'immersion initiale, si les spécimens flottent, les pipeter délicatement et les placer au fond de la solution TS.
- Les étapes 9 à 12 doivent être effectuées à température ambiante (entre 22 et 27 °C).
- À température ambiante : déposer de façon aseptique une (1) goutte de 50 µl de solution DS dans une boîte de Pétri stérile (voir le schéma Cryolock, figure 2)
- Transférer les spécimens dans la solution DS et laisser reposer pendant 4 minutes. Pipeter délicatement les spécimens une fois pour assurer un rinçage complet avec la solution DS.

REMARQUE : les spécimens demeurent rétrécis pendant l'exposition à la solution DS.

- Pendant les 4 minutes d'exposition à la solution DS, déposer de façon aseptique deux (2) gouttes de 50 µl de solution de lavage WS (WS1, WS2), comme illustré sur le schéma.
- Transférer les spécimens dans la goutte WS1 puis dans la goutte WS2, pendant 4 minutes dans chaque goutte, sans agitation.

REMARQUE : les spécimens doivent retrouver leur taille initiale au bout de 2 à 3 minutes d'incubation dans la solution WS.

- Transférer le ou les OVOCYTES réchauffés dans un milieu de culture pré-équilibré avec 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique pour la période de rétablissement (2 à 3 heures afin de permettre au fuseau méiotique de se reformer) avant toute manipulation ultérieure.

Les EMBRYONS réchauffés peuvent être utilisés de deux façons :

- Pour un transfert immédiat à la patiente : transférer les EMBRYONS dans un milieu de « transfert » pré-équilibré contenant 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique.
- Pour poursuivre la culture : transférer les EMBRYONS dans un milieu de culture pré-équilibré contenant 20 % (vol/vol) ou 12 mg/ml de supplément protéique pour une période de rétablissement de 4 heures. Après la période de rétablissement, transférer les EMBRYONS dans un milieu de culture contenant 10 % (v/v) de protéines et les incuber de façon appropriée jusqu'à ce que le stade de développement désiré soit atteint pour le transfert à la patiente.

Pour plus de détails sur l'utilisation de ces produits, chaque laboratoire doit consulter ses propres procédures et protocoles standard qui ont été spécialement élaborés et optimisés pour chaque établissement médical particulier.

CONSIGNES DE CONSERVATION ET STABILITÉ

Conservé les tubes non entamés réfrigérés entre 2 et 8 °C. Conservées comme indiqué ci-dessus, les solutions du Vitrification Thaw Kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes des tubes.

Ne pas utiliser les milieux au-delà de huit (8) semaines à compter de l'ouverture des récipients.

Le produit contenant du matériel d'origine humaine, il peut produire des particules pendant le stockage. Ce type de particules n'aurait aucun effet sur les performances du produit.

PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Ce dispositif est destiné à une utilisation par un personnel formé aux techniques de procréation médicalement assistée. Ces procédures incluent l'application indiquée pour laquelle ce dispositif est prévu.

L'établissement de l'utilisateur de ce dispositif est tenu de veiller à la traçabilité du produit et doit se conformer aux réglementations nationales en matière de traçabilité, le cas échéant.

Ne pas utiliser de solution trouble, contenant des particules, dont la couleur a viré, ou dont le tube est détérioré ou présente des fuites. Jeter le produit conformément aux réglementations en vigueur.

Pour éviter les problèmes de contamination, manipuler en appliquant des techniques aseptiques.

Actuellement, la documentation de recherche indique que les effets à long terme de la vitrification sur les ovocytes et les embryons restent inconnus.

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

UE : les mesures standard pour éviter les infections résultant de l'utilisation de produits médicaux fabriqués à partir de sang ou de plasma humain incluent la sélection des donneurs, la recherche de marqueurs spécifiques d'infection sur les dons individuels et les mélanges de plasma et l'inclusion d'étapes de fabrication efficaces pour l'inactivation/l'élimination des virus. En dépit de ces mesures, lorsque des produits médicaux fabriqués à partir de sang ou de plasma humain sont administrés à un patient, la possibilité de transmission d'agents infectieux ne peut être totalement exclue. Cela s'applique également aux virus inconnus ou émergents et autres pathogènes. Aucun cas de transmission de virus n'a été signalé avec l'albumine fabriquée conformément aux spécifications de la pharmacopée européenne selon des procédés établis. Lors de chaque administration d'un milieu de culture pour la procréation de Irvine Scientific, LLC à une patiente, il est vivement recommandé d'enregistrer le nom et le numéro de lot du produit afin d'établir un lien entre la patiente et le lot du produit.

États-Unis : ce produit contient de l'albumine sérique humaine (HSA). Le matériel d'origine humaine utilisé dans la fabrication de ce produit a été testé par des kits approuvés par la FDA. Aucune réaction n'a été observée avec les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (VHC) ni avec ceux dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cependant, il n'y a pas de méthode d'analyse qui permette de garantir de façon absolue que les produits d'origine humaine ne sont pas contaminés. Manipuler tout matériel d'origine humaine comme s'il était susceptible de transmettre une infection en utilisant les précautions d'usage universelles. Les donneurs à l'origine de ce matériel ont tous subi un test de dépistage de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

CONTRE-INDICATIONS

Le produit contient du sulfate de gentamicine. Des précautions particulières doivent être prises pour s'assurer que la patiente ne présente aucune sensibilité à cet antibiotique.

ADVERTÊNCIA (UE): apenas para uso profissional.

INDICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO

O Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) destina-se a ser utilizado na descongelação de oócitos vitrificados (MI), zigotos pronucleares (PN) até embriões até ao 3.º dia do estágio de clivagem embrionária e embriões no estágio de blastocistos que tenham sido vitrificados com o Vitrification Freeze Kit (ref.º 90133-SO)

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

A **Thawing Solution-TS** é uma solução com tampão HEPES de Medium-199 contendo sulfato de gentamicina, sacarose 1,0 M e suplemento de soro com dextrano (DSS) a 20% (v/v).

A **Dilution Solution-DS** é uma solução com tampão HEPES de Medium-199 contendo sulfato de gentamicina, sacarose 0,5 M e DSS a 20% (v/v).

A **Washing Solution-WS** é uma solução com tampão HEPES de Medium-199 contendo sulfato de gentamicina e DSS a 20% (v/v).

O DSS é um suplemento proteico composto por 50 mg/ml de albumina sérica humana (HSA) de categoria terapêutica e 20 mg/ml de dextrano.

O DSS é utilizado a 20% (v/v) no Vit Kit-Thaw para uma concentração final de 10 mg/ml de HSA e 4 mg/ml de dextrano.

Estas três soluções destinam-se a ser utilizadas em sequência de acordo com o protocolo de aquecimento em microgota por etapas.

COMPOSIÇÃO

<u>Sais e iões</u>	Amido de ácido nicotínico	<u>Fonte de proteína</u>	Prolina	<u>Outro</u>
Cloreto de sódio	Ácido pantoténico	Albumina sérica humana	Tirosina	Guanina
Fosfato de sódio	Riboflavina	<u>Tampões</u>	Alanina	Hipoxantina
Cloreto de potássio	Ácido aspártico	Bicarbonato de sódio	Leucina	Timina
Sulfato de magnésio	Ácido glutâmico	HEPES	Isoleucina	Uracilo
Acetato de sódio	Isotoleucina	<u>Indicador de pH</u>	Leucina	Xantina
Cloreto de cálcio	Metionina	Vermelho de fenol	Metionina	Adenosina
Nitrato de ferro	Finilalanina	<u>Macromoléculas</u>	Serina	Sulfato de adenina
Cloreto de colina	Sacrose	Sacarose	Treonina	Desoxirribose
<u>Vitaminas e minerais</u>	Dextrano	Dextrano	Triptofano	Ribose
Ácido ascórbico	<u>Antioxidante</u>	<u>Aminoácidos</u>	Valina	<u>Água</u>
Ácido aminobenzoico	Glutathione	Arginina	Cisteína	Qualidade WFI (água p/ preparações injetáveis)
Calciferol	<u>Antibiótico</u>	Glicina	Hidroxiprolina	
Ácido fólico	Sulfato de gentamicina	Histidina	Cistina	
Ácido nicotínico	<u>Substratos energéticos</u>	Lisina		
	Glucose			
	Inositol			

GARANTIA DE QUALIDADE

As soluções contidas no Vit Kit-Thaw são filtradas por membrana e processadas assepticamente de acordo com procedimentos de fabrico validados.

Cada lote de Vit Kit-Thaw é submetido aos seguintes testes:

Soluções:

Endotoxinas pelo ensaio de lisado de amebócitos de Limulus (LAL) ($\leq 0,6$ UE/ml)

Ensaio em embrião de ratinho (uma célula) ($\geq 80\%$ blastocistos expandidos)

Esterilidade pelo teste de esterilidade atual da USP <71> (aprovado)

Todos os resultados estão descritos no certificado de análise específico de cada lote, disponível a pedido.

PARA O AQUECIMENTO DA CRYOTIP COMO TRANSPORTADOR:

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Conector (ref.º 40736) ou adaptador
- Placas de Petri estéreis (50 mm X 9 mm, Falcon 351006 ou equivalente)
- Luvas descartáveis
- Seringa Hamilton GASTIGHT® (50 µl) ref.º 80901
- Pipetas de transferência (pipetas de vidro estirado ou pontas de micropipetas com um diâmetro interno na ponta de ~200 µm)
- Pinça
- Cronómetro ou temporizador
- Reservatório de azoto líquido (Dewar ou recipiente de isopor com tampa, 1 l-2 l de volume)
- Azoto líquido (volume suficiente para ficar com cerca de 4 polegadas [10 cm] de profundidade no reservatório)
- Tesoura afiada (estéril)
- Banho-maria a 37 °C
- Meio de cultura com proteína, pré-equilibrado a 37 °C em incubadora de CO₂ antes do procedimento de descongelação.
- Incubadora a 37 °C sem CO₂, ou placa de aquecimento

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Componentes do Vit Kit-Thaw (por aplicação):

- 50 µl de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS
- 1 conector

PROTOCOLO DE AQUECIMENTO

(PARA OÓCITOS E EMBRIÕES):

NOTA: Os procedimentos devem ser realizados à temperatura ambiente (20 °C–27 °C). NÃO aquecer a platina do microscópio para os seguintes procedimentos.

CUIDADO: Reduzir ao mínimo a exposição do espécime à luz durante manipulações das soluções de descongelação.

1. Antes do aquecimento dos espécimes vitrificados, deixar o volume das soluções TS, DS e WS a utilizar atingir a temperatura ambiente (20 °C–27 °C).

NOTA: Evitar levar tubos inteiros de TS, DS e WS à temperatura ambiente repetidamente quando for necessário apenas um pequeno volume da solução de cada vez. É melhor dividir em aliquotas na quantidade a utilizar e voltar a colocar os tubos a 2 °C–8 °C imediatamente após a divisão em aliquotas.

2. Encher o reservatório de azoto líquido com azoto líquido (~80% cheio) e colocá-lo próximo do congelador de LN₂ que contém os espécimes a descongelar.
3. Retirar as varetas com taças, contendo as CryoTips com os espécimes vitrificados, do armazenamento em azoto líquido e transferi-los para o reservatório cheio de azoto líquido.

CUIDADO: Certificar-se de que, durante a transferência do armazenamento para o reservatório de LN₂, as CryoTips permanecem submersas em LN₂ (na taça), para impedir a descongelação descontrolada dos espécimes.

Colocar o reservatório próximo do microscópio para uma manipulação rápida.

4. Identificar uma placa de Petri (ou tampa) estéril com as informações necessárias.
5. Inverter cuidadosamente cada tubo de TS, DS e WS duas vezes para misturar o conteúdo antes de utilizar.
6. Preparar a placa com gotas das soluções para o protocolo de aquecimento, como indicado a seguir:
Dispensar assepticamente uma sequência de 2 microlitros numa tampa invertida de uma placa de Petri estéril, como ilustrado na Figura 1, e colocar a placa na platina do microscópio:

- uma gota de 50 µl de TS
- uma gota de 50 µl de DS
- (duas gotas de WS serão preparadas posteriormente no passo 11)

7. Colocar o banho-maria a 37 °C próximo do microscópio. Ter o seguinte material à mão: uma pipeta de transferência e pontas, tesoura afiada estéril, seringa de Hamilton e toalhetes estéreis.

8. Utilizar uma pinça para recuperar a CryoTip específica da vareta em azoto líquido, mergulhar rapidamente a CryoTip no banho-maria a 37 °C (≥ 500 ml) e girar cuidadosamente durante 3 segundos para aquecer (ver Figura 2) a +24 000 °C/min.

9. Dispensar rapidamente o conteúdo da CryoTip, da seguinte forma (ver Figura 3):

- Secar rapidamente a CryoTip com um toalhete estéril
- Remover a manga de cobertura metálica
- Cortar o selo na extremidade larga da CryoTip na marca n.º 4
- Fixar a extremidade da CryoTip de forma segura à seringa Hamilton ou a uma ferramenta de aspiração adequada, utilizando um conector ou adaptador.

NOTA: Levantar o êmbolo da seringa cerca de 0,5 polegadas (1,3 cm) antes de fixar a seringa ao conector e à CryoTip.

- Secar cuidadosamente a ponta fina com um toalhete estéril.
- Com a CryoTip posicionada sobre a placa de descongelação preparada, cortar rapidamente o selo na marca n.º 2 da extremidade com ponta fina e dispensar o conteúdo da CryoTip como uma pequena gota (~1 µl) sobre uma região seca da placa por cima da gota de solução TS (ver Figura 4).

NOTA: DURANTE A DISPENSA DO CONTEÚDO, EVITAR A FORMAÇÃO DE BOLHAS.

10. Juntar a gota da solução TS com o conteúdo da CryoTip e deixar que se misturem gradualmente durante 1 minuto (ver Figura 4).

NOTA: Os espécimes encolherão e flutuarão até à parte de cima da gota.

NOTA: Após cada transferência de espécime(s), expelir qualquer fluido restante na pipeta de transferência e extrair alguma solução da gota seguinte antes da próxima manipulação. Evitar criar bolhas durante as transferências.

11. Extrair alguma solução DS para a pipeta de transferência e transferir o(s) espécime(s) da gota da solução TS com um volume mínimo para a gota de da solução DS durante 4 minutos.

NOTA: Durante a exposição à solução DS, o espécime manter-se-á encolhido.

DURANTE ESTE PERÍODO, PREPARAR AS DUAS GOTAS DE 50 µl DE SOLUÇÃO WS (WS1, WS2), CONFORME SE MOSTRA NA FIGURA 4.

12. Transferir o(s) espécime(s) para a gota de solução WS (WS1) durante 4 minutos.

NOTA: O(s) espécime(s) deve(m) expandir até ao tamanho original dentro de 2-3 minutos em WS.

13. Em seguida, transferir o(s) espécime(s) para a segunda gota de solução WS (WS2) durante 4 minutos.

14. Transferir o(s) OÓCITO(S) aquecido(s) para um meio de cultura previamente equilibrado com suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml para recuperação (2–3 horas para dar tempo à reconstituição do fuso) antes das manipulações seguintes.

Existem duas opções para EMBRIÃO(ÕES) aquecido(s):

a) Para transferência imediata para a doente: transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de “transferência” previamente equilibrado contendo suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml.

b) Para prosseguir a cultura: transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de cultura previamente equilibrado contendo suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml durante um período de recuperação de 4 horas. Após o período de recuperação, transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de cultura com proteína a 10% (v/v) e incubar até se chegar à fase de desenvolvimento que se pretende atingir para transferir para a doente.

PARA O AQUECIMENTO DO DISPOSITIVO HSV COMO TRANSPORTADOR:

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Placa de 4 poços estéril (Nunc 179830, 144444 ou equivalente) ou placa de cultura de órgãos (BD Falcon 353037)
- Luvas descartáveis
- Pipetas de transferência
- Pinça
- Cronómetro ou temporizador
- Reservatório de azoto líquido
- Azoto líquido
- Tesoura, Knipex ou outro dispositivo de corte de arame

- Meio de cultura com proteína, pré-equilibrado a 37 °C em incubadora de CO₂ antes do procedimento de descongelamento.
- Incubadora a 37 °C sem CO₂ ou placa de aquecimento

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Componentes do Vit Kit-Thaw (por aplicação)

- 250 µl de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS

PROTOCOLO DE AQUECIMENTO

(PARA OÓCITOS E EMBRIÕES):

NOTA: As etapas de aquecimento incluem: mergulhar o dispositivo na TS a 37 °C e, depois, diluir e lavar em DS e WS à temperatura ambiente.

1. Preparar as placas de aquecimento (conforme mostrado no diagrama do dispositivo HSV):
 - A 37 °C: Dispensar asseticamente 250 µl de solução TS para uma placa de 4 poços estéril ou para uma placa de cultura de órgãos estéril e colocá-la numa incubadora a 37 °C sem CO₂ ou numa placa de aquecimento, pelo menos, 30 minutos antes do procedimento de aquecimento.

NOTA: No caso de oócitos, dispensar um mínimo de 1 ml de solução TS.

2. Identificar a(s) HSV Straw(s) a ser(em) aquecida(s) no armazenamento em LN₂ e transferi-la(s) rapidamente para o reservatório cheio de LN₂, em preparação para o procedimento de descongelamento.
3. Colocar o reservatório de LN₂ próximo do microscópio para uma rápida manipulação posterior.
4. Retirar a placa de TS da incubadora ou placa de aquecimento a 37 °C e colocá-la na platina do microscópio.
5. Levantar a palhinha o suficiente para expor a haste de manuseamento colorida. Certificar-se de que a extremidade com o(s) espécime(s) permanece mergulhada em LN₂.
6. Utilizar um Knipex (ou outro dispositivo de corte de arame) para cortar a palhinha na altura da haste de manuseamento colorida. O guia de comprimento de corte vermelho do Knipex deve ser posicionado no comprimento máximo, ou ser removido.
 - Em alternativa, usar os dedos e o polegar para girar a palhinha enquanto faz movimentos de corte com a tesoura, 10 mm acima da parte superior da haste de manuseamento colorida.
7. Com um movimento giratório, mais controlado, agarrar rapidamente a haste de manuseamento e extrai-la para fora da palhinha.
8. Mergulhar imediatamente a goteira na solução TS a 37 °C e rodar com cuidado para separar os espécimes do dispositivo, deixando-o mergulhado durante 1 minuto.

Realizar os passos 9 a 12 à temperatura ambiente (22 °C–27 °C).

- À temperatura ambiente: Dispensar asseticamente uma (1) gota de 50 µl de DS numa placa de Petri estéril.

9. Extrair alguma solução DS para a pipeta de transferência e transferir o(s) espécime(s) da gota de solução TS com um volume mínimo para a gota de da solução DS durante 4 minutos.

NOTA: Os espécimes permanecem encolhidos durante a exposição à solução DS.

DURANTE ESTE PERÍODO, PREPARAR AS DUAS GOTAS DE 50 µl DE SOLUÇÃO WS (WS1, WS2), CONFORME SE MOSTRA NO DIAGRAMA DO DISPOSITIVO HSV.

10. Transferir o(s) espécime(s) para a gota de solução WS (WS1) durante 4 minutos.

NOTA: O(s) espécime(s) deve(m) expandir até ao tamanho original dentro de 2-3 minutos em WS.

11. Em seguida, transferir o(s) espécime(s) para a segunda gota de solução WS (WS2) durante 4 minutos.
12. Transferir o(s) OÓCITO(S) aquecido(s) para um meio de cultura previamente equilibrado com suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml para recuperação (2–3 horas para dar tempo à reconstituição do fuso) antes das manipulações seguintes.

Existem duas opções para EMBRIÃO(ÕES) aquecido(s):

- a) Para transferência imediata para a doente: transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de "transferência" previamente equilibrado contendo suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml.
- b) Para prosseguir a cultura: transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de cultura previamente equilibrado contendo suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml durante um período de recuperação de 4 horas. Após o período de recuperação, transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de cultura com proteína a 10% (v/v) e incubar até se chegar à fase de desenvolvimento que se pretende atingir para transferir para a doente.

NOTA: Para uma fertilização ideal após a vitrificação, os oócitos recuperados têm de ser fertilizados utilizando a injeção intracitoplasmática de esperma (ICSI).

PARA O AQUECIMENTO DA CRYOLOCK™ COMO TRANSPORTADOR:

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Placa de 4 poços estéril ou placas de Petri pequenas estéreis (35 mm X 10 mm ou equivalente)
- Luvas descartáveis
- Pipetas de transferência
- Cronómetro ou temporizador
- Reservatório de azoto líquido
- Azoto líquido
- Meio de cultura com proteína, pré-equilibrado a 37 °C em incubadora de CO₂ antes do procedimento de descongelamento
- Incubadora a 37 °C sem CO₂ ou placa de aquecimento
- Pinça

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Componentes do Vit Kit-Thaw (por aplicação)

- 1 ml de Thawing Solution-TS
- 50 µl de Dilution Solution-DS
- 100 µl de Washing Solution-WS

PROTOCOLO DE AQUECIMENTO

NOTA: As etapas de aquecimento incluem: mergulhar o dispositivo na TS a 37 °C e, depois, diluir e lavar em DS e WS à temperatura ambiente.

1. Preparar a placa de descongelamento (como ilustrado no diagrama da Cryolock, Figura 1):
 - A 37 °C: Dispensar asseticamente um volume mínimo de 1 ml de solução TS e aquecer a 37 °C numa incubadora sem CO₂ ou numa placa de aquecimento, pelo menos, 30 minutos antes de iniciar o procedimento de aquecimento.

2. Identificar a(s) amostra(s) Cryolock a aquecer no dispositivo e transferi-la(s) rapidamente do armazenamento em LN₂ para um reservatório contendo LN₂ para preparar o procedimento de aquecimento.
3. Colocar o reservatório de LN₂ junto da área de trabalho e da platina do microscópio, tendo em vista a rápida manipulação posterior do reservatório para a solução TS.
4. Retirar a placa de TS da incubadora ou placa de aquecimento a 37 °C e colocá-la na platina do microscópio.
5. Segurar na extremidade superior do corpo da Cryolock com uma pinça, com o rótulo de identificação virado para cima.
Opção A: Retirar rapidamente e com cuidado a tampa sob o LN₂, rodando as partes até se separarem.
Opção B: Retirar rapidamente a Cryolock do LN₂ e, em seguida, retirar a tampa, rodando-a com cuidado.

NOTA: O laboratório deverá consultar os seus procedimentos e protocolos. A Opção A não está aprovada para utilização nos EUA.

6. Mergulhar imediatamente a ponta côncava da Cryolock, com o(s) espécime(s) virado(s) para cima, na solução TS a 37 °C. Sob observação microscópica, mover cuidadosamente a Cryolock até o(s) espécime(s) ser(em) libertado(s) da ponta.
7. Deixar o(s) espécime(s) durante um total de 1 minuto na solução TS.
8. Trinta (30) segundos após a submersão inicial, pipetar cuidadosamente o(s) espécime(s), se estiverem a flutuar, e colocá-los no fundo da solução TS.

Realizar os passos 9 a 12 à temperatura ambiente (22 °C–27 °C).

- À temperatura ambiente: Dispensar assepticamente uma (1) gota de 50 µl de solução DS numa placa de Petri estéril (ver o diagrama da Cryolock, Figura 2).

9. Transferir o(s) espécime(s) para a solução DS durante 4 minutos. Pipetar suavemente os espécimes uma vez, para garantir uma lavagem completa na solução DS.

NOTA: Os espécimes permanecem encolhidos durante a exposição à solução DS.

10. Durante a exposição de 4 minutos na solução DS, dispensar assepticamente duas (2) gotas de 50 µl de WS (WS1, WS2), como mostra o diagrama

11. Transferir o(s) espécime(s) para WS1 e depois para WS2 durante 4 minutos em cada uma, deixando-o(s) em repouso.

NOTA: O(s) espécime(s) deve(m) expandir até ao tamanho original dentro de 2-3 minutos em WS.

12. Transferir o(s) OOCITO(S) aquecido(s) para um meio de cultura previamente equilibrado com suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml para recuperação (2–3 horas para dar tempo à reconstituição do fuso) antes das manipulações seguintes.

Existem duas opções para EMBRIÃO(ÕES) aquecido(s):

- a) Para transferência imediata para a doente: transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de "transferência" previamente equilibrado contendo suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml.
- b) Para prosseguir a cultura: transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de cultura previamente equilibrado contendo suplemento proteico a 20% (v/v) ou 12 mg/ml durante um período de recuperação de 4 horas. Após o período de recuperação, transferir o(s) EMBRIÃO(ÕES) para o meio de cultura com proteína a 10% (v/v) e incubar até se chegar à fase de desenvolvimento que se pretende atingir para transferir para a doente.

Para obter mais informações sobre a utilização destes produtos, cada laboratório deve consultar os respetivos procedimentos e protocolos que tenham sido concebidos e otimizados especificamente para o seu programa médico.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Conservar os tubos por abrir refrigerados entre 2 °C e 8 °C. Quando conservadas de acordo com as instruções, as soluções do Vitrification Thaw Kit mantêm-se estáveis até à data de validade indicada nos rótulos dos tubos.

Não utilizar os meios decorridas mais de oito (8) semanas após a abertura dos recipientes.

Como o produto contém material de origem humana, poderão desenvolver-se partículas durante a conservação. Não se conhecem efeitos destas partículas no desempenho do produto.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

Este dispositivo foi concebido para ser utilizado por pessoal com formação em técnicas de reprodução assistida. Estas técnicas incluem a aplicação prevista para a qual este dispositivo foi concebido.

A instituição do utilizador deste dispositivo é responsável pela manutenção da rastreabilidade do produto e tem de cumprir a legislação nacional sobre rastreabilidade, sempre que aplicável.

Não utilizar nenhum tubo de solução que apresente evidências de danos, fugas, partículas ou turvação, ou que tenha mudado de cor. Eliminar o produto de acordo com as regulamentações aplicáveis.

Para evitar problemas de contaminação, manipular o produto em condições de assepsia.

A literatura de investigação atual indica que não se conhecem os efeitos da vitrificação em oócitos e embriões a longo prazo.

Não utilizar nenhum frasco cuja embalagem estéril tenha sido comprometida.

UE: As medidas padrão para prevenir infeções resultantes da utilização de produtos medicamentosos preparados a partir de sangue ou plasma humano incluem a seleção de doadores, o rastreio de cada um dos produtos doados e de bancos de plasma para deteção de marcadores de infeção específicos, bem como a inclusão de etapas de fabrico eficazes para a inativação/eliminação de vírus. Não obstante estes cuidados, não é possível excluir totalmente a possibilidade de transmissão de agentes infecciosos quando se administram produtos medicinais preparados a partir de sangue ou plasma humano. Isto também se aplica a vírus desconhecidos ou emergentes, bem como a outros agentes patogénicos. Não há relatos que documentem a transmissão de vírus com albumina fabricada de acordo com as especificações da Farmacopeia Europeia através de processos comprovados. Recomenda-se vivamente que, sempre que produtos de meios reprodutivos da Irvine Scientific, LLC sejam administrados a uma doente, se registre o nome e o número de lote do produto, de modo a manter uma ligação entre cada doente e o lote do produto.

EUA: Este produto contém albumina sérica humana (HSA). Os materiais de origem humana usados no fabrico deste produto foram testados com kits aprovados pela FDA não sendo reativos aos anticorpos da hepatite C (VHC) e aos anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (VIH). No entanto, nenhum método de teste oferece garantia absoluta de que os produtos derivados de materiais de origem humana não sejam infecciosos. Manusear todos os materiais de origem humana como potencialmente passíveis de transmitir infeções, adotando precauções universais. Os doadores do material de origem também foram submetidos a testes para despiste da Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ).

CONTRAINDICAÇÕES

O produto contém sulfato de gentamicina. Devem ser tomadas as precauções adequadas para assegurar que o doente não é sensível ao antibiótico.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ Ε.Ε.: Για επαγγελματική χρήση μόνο.

ΕΝΔΕΙΞΗ ΧΡΗΣΗΣ

Το Vit Kit-Thaw (kit Υαλοποίησης Απόψυξης) προορίζεται για χρήση κατά την απόψυξη των υαλοποιημένων ωοκυττάρων (MI), των προπυρηνικών (PN) ζυγωτών, των εμβρύων σε στάδιο σχάσης ημέρας 3 και των εμβρύων σε στάδιο βλαστοκύστης που έχουν υαλοποιηθεί με χρήση του Vitrification Freeze Kit (Αρ. καταλόγου 90133-SO)

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το **Thawing Solution-TS** είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Μέσου-199, το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη, 1,0 M σακχαρόζη και αιθυλενογλυκόλη και 20% (κ.ό.) συμπλήρωμα ορού δεξτράνης (DSS).

Το **Dilution Solution-DS** είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Μέσου-199, το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη, 0,5 M σακχαρόζη και 20% (κ.ό.) συμπλήρωμα ορού δεξτράνης (DSS).

Το **Washing Solution-WS** είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Μέσου-199, το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη και 20% (κ.ό.) συμπλήρωμα ορού δεξτράνης (DSS).

Το DSS είναι ένα συμπλήρωμα πρωτεΐνης το οποίο περιέχει 50 mg/ml ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA) θεραπευτικού τύπου και 20 mg/ml δεξτράνης. Το DSS χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 20% (κ.ό.) στο Vit Kit-Thaw για επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 10 mg/ml HSA και 4 mg/ml δεξτράνης.

Αυτά τα τρία διαλύματα προορίζονται για χρήση διαδοχικά, σύμφωνα με το πρωτόκολλο θέρμανσης σε στάδια με μικροσταγόνα.

ΣΥΝΘΕΣΗ

Άλατα και ιόντα	Αμιδίο νικοτινικού οξέος	Πηγή πρωτεΐνης	Προλίνη	Άλλα
Χλωριούχο νάτριο	Παντοθενικό οξύ	Ανθρώπινη αλβουμίνη ορού	Τυροσίνη	Γουανίνη
Φωσφορικό νάτριο	Ριβοφλαβίνη		Αλανίνη	Υποξανθίνη
Χλωριούχο κάλιο	Πυριδοξίνη	<u>Ρυθμιστικά διαλύματα</u>	Ασπαρτικό οξύ	Θυμίνη
Θειικό μαγνήσιο	Θειαμίνη	Διπτανθρακικό νάτριο	Γλουταμικό οξύ	Ουρακίλη
Οξικό νάτριο	Βιοτίνη	HEPES	Ισολευκίνη	Ξανθίνη
Χλωριούχο ασβέστιο	Άλφα τοκοφερόλη	<u>Δείκτης pH</u>	Λευκίνη	Αδενοσίνη
Νιτρικός σίδηρος	Διθειώδες νάτριο	Ερυθρό της φαινόλης	Μεθειονίνη	Θειική αδερίνη
Χλωριούχος χολίνη	<u>Αντιοξειδωτικό</u>	<u>Μακρομόρια</u>	Φαινυλαλανίνη	Δεοξυριβόζη
<u>Βιταμίνες και</u>	Γλουταθειόνη	Σακχαρόζη	Σερίνη	Ριβόζη
<u>μεταλλικά στοιχεία</u>	<u>Αντιβιοτικό</u>	Δεξτράνη	Θρεονίνη	<u>Νερό</u>
Ασκαρβικό οξύ	Θειική γενταμικίνη	<u>Αμινοξέα</u>	Τρυπτοφάνη	Ποιότητα ενέσιμου
Αμινοβενζοϊκό οξύ	<u>Ενεργειακά</u>	Αργινίνη	Βαλίνη	υδάτος (WFI)
Καλσιφερόλη	<u>υποκατάστατα</u>	Γλυκίνη	Κυστίνη	
Φυλλικό οξύ	Γλυκόζη	Ιστιδίνη	Υδροξυπρολίνη	
Νικοτινικό οξύ	Ινοσιτόλη	Λυσίνη	Κυστίνη	

ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Τα διαλύματα που περιλαμβάνονται στο Vit Kit-Thaw διηθούνται με μεμβράνη και υποβάλλονται σε επεξεργασία με άσηπτη τεχνική, με την εφαρμογή επικυρωμένων διαδικασιών παραγωγής.

Κάθε παρτίδα του Vit Kit-Thaw υποβάλλεται στις ακόλουθες δοκιμασίες:

Διαλύματα:

Ενδοξίνη με τη μεθοδολογία προϊόντων λύσης αμοιβαδοειδών κυττάρων Limulus (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Προσδιορισμό εμβρύου ποντικών (ενός κυττάρου) (σε διόγκωση της βλαστοκύστης $\geq 80\%$)

Στεριότητα μέσω της τρέχουσας δοκιμασίας στεριότητας κατά USP <71> (Επιτυχής)

Όλα τα αποτελέσματα αναφέρονται σε Πιστοποιητικό Ανάλυσης ειδικό ανά παρτίδα, το οποίο διατίθεται κατόπιν αιτήματος.

ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΤΟΥ CRYOTIP ΩΣ ΦΟΡΕΑ:

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ

- Σύνδεσμος (Αρ. καταλόγου 40736) ή προσαρμογέας
- Στείρα τρυβλία petri (50 X 9 mm, Falcon 351006 ή ισοδύναμα)
- Αναλώσιμα γάντια
- Σύριγγα Hamilton GASTIGHT® (50 μ l), Αρ. καταλόγου 80901
- Πιπέτες μεταφοράς (πιπέτες από γυαλί διαμορφωμένο με έλξη ή άκρα μικροπιπτετών με εσωτερική διάμετρο άκρου ~200 μ m)
- Λαβίδα
- Χρονόμετρο ή χρονοδιακόπτης
- Δεξαμενή υγρού αζώτου (δοχείο dewar ή δοχείο από αφρό styrofoam με καπάκι, όγκου 1-2 l)
- Υγρό άζωτο (επαρκής όγκος για την επίτευξη βάθους 4 ιντσών (10 cm) στη δεξαμενή)
- Αιχμηρό ψαλίδι (στείρο)
- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C
- Μέσο καλλιέργειας με πρωτεΐνη, προ-εξισορροπημένο στους 37 °C σε επωαστήρα CO₂ πριν από τη διαδικασία απόψυξης.
- Επωαστήρας 37 °C χωρίς CO₂ ή θερμαινόμενη τράπεζα.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Εξαρτήματα Vit Kit-Thaw (ανάλογα με την εφαρμογή):

- 50 μ l Thawing Solution-TS
- 50 μ l Dilution Solution-DS
- 100 μ l Washing Solution-WS
- 1 σύνδεσμος

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ

(ΓΙΑ ΔΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΑ):

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι διαδικασίες πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-27 °C). ΜΗ χρησιμοποιείτε μικροσκόπιο με θερμαινόμενη τράπεζα για τις ακόλουθες διαδικασίες.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ: Περιορίστε στο ελάχιστο την έκθεση του δείγματος στο φως κατά τη διάρκεια των χειρισμών με τα διαλύματα απόψυξης.

- Πριν από τη θέρμανση των υαλοποιημένων δειγμάτων, φέρτε την ποσότητα των διαλυμάτων TS, DS και WS που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (20-27 °C).
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αποφεύγετε να φέρετε ολόκληρα τα φιαλίδια των διαλυμάτων TS, DS και WS σε θερμοκρασία δωματίου επανειλημμένα, κάθε φορά που χρειάζεται μια μικρή ποσότητα των διαλυμάτων. Είναι καλύτερο να γίνεται κλασματοποίηση της ποσότητας που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και να επανέρχονται τα φιαλίδια σε θερμοκρασία 2-8 °C αμέσως μετά την κλασματοποίηση.
- Πληρώστε τη δεξαμενή υγρού αζώτου με υγρό άζωτο (πλήρωση ~80 %) και τοποθετήστε κοντά στον καταψύκτη LN₂ που περιέχει τα δείγματα που πρόκειται να αποψυχθούν.
- Αφαιρέστε τις ράβδους με τα κύπελλα που περιέχουν τα CryoTip με τα υαλοποιημένα δείγματα από τον περιέκτη φύλαξης υγρού αζώτου και μεταφέρετέ τα στη δεξαμενή που έχει πληρωθεί με υγρό άζωτο.
ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ: Βεβαιωθείτε ότι τα CryoTip παραμένουν εμβυθισμένα στο LN₂ (στο κύπελλο) κατά τη διάρκεια της μεταφοράς από τον περιέκτη φύλαξης στη δεξαμενή LN₂, ώστε να αποφευχθεί η μη ελεγχόμενη απόψυξη των δειγμάτων.
Τοποθετήστε τη δεξαμενή κοντά στο μικροσκόπιο για τη διενέργεια γρήγορων χειρισμών.
- Επιστημονείστε ένα αποστειρωμένο τρυβλίο petri (ή καπάκι) με τις απαραίτητες πληροφορίες.
- Αναστρέψτε με ήπιες κινήσεις κάθε φιαλίδιο TS, DS και WS δύο φορές για να αναμιχθούν τα περιεχόμενα, πριν από τη χρήση.
- Προετοιμάστε το τρυβλίο με σταγόνες διαλυμάτων για το πρωτόκολλο θέρμανσης, ως εξής:
Διανεμίστε με άσηπτη τεχνική διαδοχικά 2 μικροσταγόνες σε ένα ανεσταρρωμένο κατάκι στείρου τρυβλίου Petri, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 και τοποθετήστε το τρυβλίο στην τράπεζα του μικροσκοπίου:
 - μία σταγόνα 50 μl TS
 - μία σταγόνα 50 μl DS
 - (Δύο σταγόνες WS θα προετοιμαστούν αργότερα στο βήμα 11)
- Τοποθετήστε το υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C κοντά στο μικροσκόπιο. Έχετε κοντά σας τα εξής: πιπέτα μεταφοράς και άκρα, στείρο αιχμηρό ψαλίδι, σύριγγα Hamilton και στείρα μαντηλάκια.
- Χρησιμοποιώντας λαβίδα (ή τσιμπίδα), ανακτήστε το συγκεκριμένο CryoTip από τη ράβδο μέσα στο υγρό άζωτο, εμβυθίστε γρήγορα το CryoTip στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C (≥ 500 ml) και περιδινίστε με ήπιες κινήσεις επί 3 δευτερόλεπτα ώστε να θερμανθούν (βλ. Εικόνα 2) με ρυθμό + 24.000 °C/λεπτό.
- Διανεμίστε γρήγορα το περιεχόμενο του CryoTip ως εξής (βλ. Εικόνα 3):
 - Σκουπίστε γρήγορα το CryoTip με ένα στείρο μαντηλάκι ώστε να στεγνώσει
 - Αφαιρέστε το μεταλλικό χιτώνιο κάλυψης
 - Κόψτε τη σφράγιση στο πλατύ άκρο του CryoTip, στη σήμανση αρ. 4
 - Συνδέστε στέρεα το πλατύ άκρο του CryoTip με τη σύριγγα Hamilton ή με κατάλληλο εργαλείο αναρρόφησης, χρησιμοποιώντας σύνδεσμο ή προσαρμολέα.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ανασηκώστε το έμβολο της σύριγγας περίπου 0,5 ίντσες (1,3 cm) προτού συνδέσετε τη σύριγγα στον σύνδεσμο και το CryoTip.
 - Σκουπίστε με ήπιες κινήσεις το λεπτό άκρο με ένα στείρο μαντηλάκι ώστε να στεγνώσει.
 - Έχοντας το CryoTip τοποθετημένο επάνω από το παρασκευασμένο τρυβλίο απόψυξης, κόψτε γρήγορα τη σφράγιση στη σήμανση αρ. 2 το λεπτού άκρου και διανεμίστε το περιεχόμενο του CryoTip ως μικρή σταγόνα (~ 1 μl) σε στεγνή περιοχή του τρυβλίου επάνω από τη σταγόνα TS (βλ. Εικόνα 4).
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΑΠΟΦΥΓΕΤΕ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΦΥΣΑΛΙΔΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ.
- Ενώστε την σταγόνα TS με το περιεχόμενο του CryoTip και αφήστε το να αναμιχθεί βαθμιαία για 1 λεπτό (βλ. Εικόνα 4).
Σημειώση: Τα δείγματα θα συρρικνωθούν και θα επιπλεύσουν στην κορυφή της σταγόνας.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Μετά τη μεταφορά κάθε δείγματος, φυσήξτε τυχόν υγρό που απομένει από την πιπέτα μεταφοράς και αναρροφήστε μια μικρή ποσότητα διαλύματος από την επόμενη σταγόνα πριν από τον επόμενο χειρισμό. Αποφύγετε τη δημιουργία φυσαλίδων κατά τις μεταφορές.
- Αναρροφήστε μια μικρή ποσότητα DS στην πιπέτα μεταφοράς και μεταφέρετέ τα ή τα δείγματα από τη σταγόνα του TS με ελάχιστο όγκο στην σταγόνα του DS επί 4 λεπτά.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το δείγμα θα παραμείνει συρρικνωμένο κατά την έκθεση στο DS.
ΣΕ ΑΥΤΟ ΤΟ ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΤΕ ΤΙΣ ΔΥΟ ΣΤΑΓΟΝΕΣ 50 μl ΤΟΥ WS (WS1, WS2), ΟΠΩΣ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΙΚΟΝΑ 4.
- Μεταφέρετε το ή τα δείγματα στην σταγόνα του WS (WS1) επί 4 λεπτά.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το ή τα δείγματα θα πρέπει να έχουν επανέλθει στο αρχικό τους μέγεθος εντός 2-3 λεπτών στο WS.
- Στη συνέχεια, μεταφέρετε το ή τα δείγματα στη δεύτερη σταγόνα του WS (WS2) επί 4 λεπτά.
- Μεταφέρετε το ή τα θερμασμένα ΔΟΚΥΤΤΑΡΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας, με συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml για αποκατάσταση (2-3 ώρες, προκειμένου να υπάρχει χρόνος για την ανάπλαση της αράκτου), πριν από τους επόμενους χειρισμούς.
Υπάρχουν δύο επιλογές για το ή τα ΕΜΒΡΥΑ που έχουν θερμανθεί:
 - α) Για άμεση μεταφορά στην ασθενή: μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο «μεταφοράς» το οποίο περιέχει συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml.
 - β) Για περαιτέρω καλλιέργεια: μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας το οποίο περιέχει συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml, για μια περίοδο αποκατάστασης 4 ωρών. Μετά την περίοδο αποκατάστασης, μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ στο μέσο καλλιέργειας με πρωτεΐνη 10% (κ.ό.) και επώαστε κατάλληλα, ωστόσο επιτευχθεί το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης για μεταφορά στην ασθενή.

ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ HSV ΩΣ ΦΟΡΕΑ:

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ

- Στείρο τρυβλίο 4 υποδοχών (Nunc 179830, 144444 ή ισοδύναμο) ή τρυβλίο οργανικής καλλιέργειας (BD Falcon 353037)
- Αναλώσιμα γάντια
- Πιπέτες μεταφοράς
- Λαβίδα
- Χρονόμετρο ή χρονοδιακόπτης
- Δεξαμενή υγρού αζώτου
- Υγρό άζωτο

- Ψαλίδι, Knipex ή άλλη συσκευή κοπής σύρματος
- Μέσο καλλιέργειας με πρωτεΐνη, προ-εξισορροπημένο στους 37 °C σε επωαστήρα CO₂ πριν από τη διαδικασία απόψυξης.
- Επωαστήρας 37 °C χωρίς CO₂ ή θερμαινόμενη τράπεζα

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Εξαρτήματα Vit Kit-Thaw (ανάλογα με την εφαρμογή)

- 250 μl Thawing Solution-TS
- 50 μl Dilution Solution-DS
- 100 μl Washing Solution-WS

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ

(ΓΙΑ ΟΩΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΑ):

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα βήματα θέρμανσης περιλαμβάνουν την εμφύσηση της συσκευής στο TS σε θερμοκρασία 37 °C και τη συνακόλουθη αραίωση και πλύση σε DS και WS σε θερμοκρασία δωματίου.

1. Προετοιμασία των τρυβλίων θέρμανσης (όπως φαίνεται στο διάγραμμα της συσκευής HSV):
 - Στους 37 °C: Διανείμετε με άσηπτη τεχνική 250 μl TS σε ένα στερό τρυβλίο 4 υποδοχών ή σε ένα τρυβλίο οργανικής καλλιέργειας και τοποθετήστε το σε έναν επωαστήρα 37 °C χωρίς CO₂ ή σε θερμαινόμενη τράπεζα, τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη διαδικασία θέρμανσης
- ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για ωκύτταρα, διανείμετε τουλάχιστον 1 ml TS
2. Προσδιορίστε την ή τις παγιέτες HSV που πρόκειται να θερμανθούν από τον περιέκτη φύλαξης LN₂ και μεταφέρετέ τις γρήγορα στη δεξαμενή που έχει πληρωθεί με LN₂ για την προετοιμασία για τη διαδικασία απόψυξης.
3. Τοποθετήστε τη δεξαμενή LN₂ κοντά στο μικροσκόπιο ώστε να διενεργηθούν γρήγορα οι επόμενοι χειρισμοί.
4. Απομακρύνετε το τρυβλίο TS από τον επωαστήρα 37 °C ή τη θερμαινόμενη τράπεζα και τοποθετήστε το υπό εστίαση, επάνω στην τράπεζα του μικροσκοπίου.
5. Σηκώστε αρκετά την παγιέτα ώστε να αποκαλύψετε την έγχρωμη ράβδο χειρισμού. Βεβαιωθείτε ότι το άκρο με το ή τα δείγματα παραμένει εμβυθισμένο στο LN₂.
6. Χρησιμοποιήστε ένα Knipex (ή άλλη συσκευή κοπής σύρματος) για να κόψετε την παγιέτα στο ύψος της έγχρωμης ράβδου χειρισμού. Ο κόκκινος οδηγός μήκους κοπής στο Knipex θα πρέπει να τοποθετηθεί στη θέση μέγιστου μήκους ή να αφαιρεθεί.
 - Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε τον αντίχειρα και τα δάκτυλα για να περιστρέψετε την παγιέτα ενώ την κόβετε με το ψαλίδι, 10 mm κάτω από την κορυφή της έγχρωμης ράβδου χειρισμού.
7. Με μια γρήγορη αλλά ελεγχόμενη κίνηση, πιάστε γρήγορα τη ράβδο χειρισμού και βγάλτε την από την παγιέτα.
8. Βυθίστε αμέσως την ούλακα στο TS 37 °C και περιδινίστε με ήπιες κινήσεις ώστε να αποκολληθούν τα δείγματα από τη συσκευή και αφήστε τα επί 1 λεπτό.

Τα βήματα 9-12 πρέπει να εκτελεστούν σε θερμοκρασία δωματίου (22-27 °C).

- Σε θερμοκρασία δωματίου: Διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία (1) σταγόνα 50 μl DS σε ένα στερό τρυβλίο Petri
9. Αναρροφήστε μια μικρή ποσότητα DS στην πιπέτα μεταφοράς και μεταφέρετε το ή τα δείγματα από τη σταγόνα TS με ελάχιστο όγκο στην σταγόνα του DS επί 4 λεπτά.
 - ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το δείγμα θα παραμένει συρρικνωμένο κατά την έκθεση στο DS.
 - ΣΕ ΑΥΤΟ ΤΟ ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΤΕ ΤΙΣ ΔΥΟ ΣΤΑΓΟΝΕΣ 50 μl ΤΟΥ WS (WS1, WS2), ΟΠΩΣ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΣΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ HSV.
 10. Μεταφέρετε το ή τα δείγματα στην σταγόνα του WS (WS1) επί 4 λεπτά.
 - ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το ή τα δείγματα θα πρέπει να έχουν επανέλθει στο αρχικό τους μέγεθος εντός 2-3 λεπτών στο WS.
 11. Στη συνέχεια, μεταφέρετε το ή τα δείγματα στη δεύτερη σταγόνα του WS (WS2) επί 4 λεπτά.
 12. Μεταφέρετε το ή τα θερμομαμένα ΟΩΚΥΤΤΑΡΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας, με συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml για αποκατάσταση (2-3 ώρες, προκειμένου να υπάρχει χρόνος για την ανάπτυξη της ατράκτου), πριν από τους επόμενους χειρισμούς.

Υπάρχουν δύο επιλογές για το ή τα ΕΜΒΡΥΑ που έχουν θερμανθεί:

- α) Για άμεση μεταφορά στην ασθενή: μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο «μεταφοράς» το οποίο περιέχει συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml.
- β) Για περαιτέρω καλλιέργεια: μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας το οποίο περιέχει συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml, για μια περίοδο αποκατάστασης 4 ωρών. Μετά την περίοδο αποκατάστασης, μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ στο μέσο καλλιέργειας με πρωτεΐνη 10% (κ.ό.) και επώαστε κατάλληλα, ωστόσο επιτευχθεί το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης για μεταφορά στην ασθενή.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα αποκατεστημένα ωκύτταρα πρέπει να γονιμοποιηθούν με χρήση ICSI για τη βέλτιστη γονιμοποίηση μετά από την υαλοτομή.

ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΤΟΥ CRYOLOCK™ ΩΣ ΦΟΡΕΑ:

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ

- Στείριος τρυβλίο 4 υποδοχών ή στείρα μικρά τρυβλία petri (35 X 10 mm ή ισοδύναμα)
- Αναλυσίμα γάντια
- Πιπέτες μεταφοράς
- Χρονόμετρο ή χρονοδιακόπτης
- Δεξαμενή υγρού αζώτου
- Υγρό αζώτο
- Μέσο καλλιέργειας με πρωτεΐνη, προ-εξισορροπημένο στους 37 °C σε επωαστήρα CO₂ πριν από τη διαδικασία απόψυξης
- Επωαστήρας 37 °C χωρίς CO₂ ή θερμαινόμενη τράπεζα
- Λαβίδα

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Εξαρτήματα Vit Kit-Thaw (ανάλογα με την εφαρμογή)

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 μl Dilution Solution-DS
- 100 μl Washing Solution-WS

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα βήματα θέρμανσης περιλαμβάνουν την εμφύσηση της συσκευής στο TS σε θερμοκρασία 37 °C και τη συνακόλουθη αραίωση και πλύση σε DS και WS σε θερμοκρασία δωματίου.

1. Προετοιμάστε το τρυβλίο απόψυξης (όπως φαίνεται στο διάγραμμα του Cryolock, Εικόνα 1):
 - Στους 37 °C: Διανείμετε με άσηπτη τεχνική έναν ελάχιστο όγκο 1 ml διαλύματος TS και θερμάνετε στους 37 °C σε έναν επωαστήρα χωρίς CO₂ ή σε μια θερμαινόμενη τράπεζα, τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από την έναρξη της διαδικασίας θέρμανσης.

2. Προσδιορίστε το ή τα δείγματα Cryolock που πρόκειται να θερμανθούν και μεταφερέτε τα γρήγορα από τον περιέκτη φύλαξης LN₂ σε μια δεξαμενή φύλαξης πληρωμένη με LN₂, για την προετοιμασία για τη διαδικασία θέρμανσης.
3. Τοποθετήστε την πληρωμένη με LN₂ δεξαμενή φύλαξης σε στενή εγγύτητα με τον χώρο εργασίας και την τράπεζα του μικροσκοπίου, προκειμένου να επιτύχετε στη συνέχεια τον ταχύ χειρισμό κατά τη μεταφορά από τη δεξαμενή στο TS.
4. Απομακρύνετε το τρυβλίο TS από τον επωαστήρα 37 °C ή τη θερμαινόμενη τράπεζα και τοποθετήστε το υπό εστίαση, επάνω στην τράπεζα του μικροσκοπίου.
5. Χρησιμοποιώντας λαβίδα, κρατήστε το επάνω άκρο του σώματος του Cryolock με την ετικέτα ταυτοποίησης στραμμένη προς τα επάνω. Επιλογή Α: Με ήπιες αλλά γρήγορες κινήσεις αφαιρέστε το πώμα κάτω από το LN₂, περιστρέφοντας τα τμήματά του έως ότου απελευθερωθεί.

Επιλογή Β: Βγάλετε γρήγορα το Cryolock από το LN₂ και στη συνέχεια αφαιρέστε γρήγορα το πώμα με μια ήπια περιστροφή.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το εργαστήριο θα πρέπει να συμβουλευτεί τις εσωτερικές του διαδικασίες και τα πρωτόκολλα. Η επιλογή Α δεν έχει λάβει έγκριση για χρήση στις Η.Π.Α.

6. Βυθίστε αμέσως το κοίλο άκρο του Cryolock, με το ή τα δείγματα στραμμένα προς τα επάνω, στο TS 37 °C. Παρατηρώντας στο μικροσκόπιο, μετακινήστε το Cryolock με ήπιες κινήσεις έως ότου το ή τα δείγματα απελευθερωθούν από το άκρο.
7. Αφήστε το ή τα δείγματα συνολικά επί 1 λεπτό στο TS.
8. Τρίαντα (30) δευτερόλεπτα μετά την αρχική βύθιση, πιπετάρετε προσεκτικά το ή τα δείγματα, εάν επιτρέπει, και τοποθετήστε τα στον πυθμένα του TS.

Τα βήματα 9-12 πρέπει να εκτελεστούν σε θερμοκρασία δωματίου (22-27 °C).

- Σε θερμοκρασία δωματίου: Διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία (1) σταγόνα 50 μl DS σε ένα στείρο τρυβλίο Petri (βλ. διάγραμμα του Cryolock, Εικόνα 2)

9. Μεταφέρετε το ή τα δείγματα στο DS επί 4 λεπτά. Πιπετάρετε προσεκτικά τα δείγματα μία φορά, για να διασφαλίσετε την πλήρη έκπλυση στο DS.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το δείγμα θα παραμείνει συρρικνωμένο κατά την έκθεση στο DS.

10. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης διάρκειας 4 λεπτών στο DS, διανείμετε με άσηπτη τεχνική δύο (2) σταγόνες 50 μl WS (WS1, WS2), όπως φαίνεται στο διάγραμμα.

11. Μεταφέρετε το ή τα δείγματα στο WS1 και έπειτα στο WS2 επί 4 λεπτά το κάθε ένα, απρόσκοπτα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το ή τα δείγματα θα πρέπει να έχουν επανέλθει στο αρχικό τους μέγεθος εντός 2-3 λεπτών στο WS.

12. Μεταφέρετε το ή τα θερμασμένα ΟΟΚΥΤΤΑΡΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας, με συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml για αποκατάσταση (2-3 ώρες, προκειμένου να υπάρχει χρόνος για την ανάπληση της τράχου), πριν από τους επόμενους χειρισμούς.

Υπάρχουν δύο επιλογές για το ή τη ΕΜΒΡΥΑ που έχουν θερμανθεί:

- α) Για άμεση μεταφορά στην ασθενή: μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο «μεταφοράς» το οποίο περιέχει συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml.
- β) Για περαιτέρω καλλιέργεια: μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ σε προ-εξισορροπημένο μέσο καλλιέργειας το οποίο περιέχει συμπλήρωμα πρωτεΐνης 20% (κ.ό.) ή 12 mg/ml, για μια περίοδο αποκατάστασης 4 ωρών. Μετά την περίοδο αποκατάστασης, μεταφέρετε το ή τα ΕΜΒΡΥΑ στο μέσο καλλιέργειας με πρωτεΐνη 10% (κ.ό.) και επώαστε κατάλληλα, ωστόσο επιτευχθεί το επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης για μεταφορά στην ασθενή.

Για πρόσθετες λεπτομέρειες σχετικά με τη χρήση των προϊόντων αυτών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να συμβουλευτεί τις δικές του εργαστηριακές διαδικασίες και πρωτόκολλα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί ειδικά για το δικό του ιατρικό πρόγραμμα.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Φυλάσσετε τα κλειστά φιαλίδια στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C. Όταν φυλάσσονται σύμφωνα με τις οδηγίες, τα διαλύματα Vitification Thaw Kit παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες των φιαλιδίων.

Μη χρησιμοποιείτε τα μέσα για περισσότερες από οκτώ (8) εβδομάδες, αφού ανοιχθούν οι περιέκτες.

Καθώς υπάρχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης στο προϊόν, μπορεί να αναπτυχθεί κάποια ποσότητα σωματιδιακής ύλης κατά τη διάρκεια της φύλαξης. Αυτό το είδος σωματιδιακής ύλης δεν είναι γνωστό να έχει επίδραση στην απόδοση του προϊόντος.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η συσκευή αυτή προορίζεται για χρήση από προσωπικό εκπαιδευμένο στις διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την υποδεικνυόμενη εφαρμογή για την οποία προορίζεται η συσκευή αυτή.

Η εγκατάσταση όπου θα χρησιμοποιηθεί αυτή η συσκευή είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ιχνηλασιμότητας του προϊόντος και πρέπει να συμμορφώνεται με τους εθνικούς κανονισμούς που αφορούν την ιχνηλασιμότητα, όπου εφαρμόζεται.

Μη χρησιμοποιείτε οποιοδήποτε φιαλίδιο διαλύματος που παρουσιάζει ενδείξεις ζημιάς, διαρροής, σωματιδιακής ύλης ή θολερότητας ή έχει αλλοιωμένο χρώμα. Απορρίψτε το προϊόν σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.

Για να αποφύγετε προβλήματα με μόλυνση, χειριστείτε εφαρμόζοντας άσηπτες τεχνικές.

Επί του παρόντος, η ερευνητική βιβλιογραφία καταδεικνύει ότι οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της υαλοποίησης στα ωκύτταρα και στα έμβρυα παραμένουν άγνωστες.

Μη χρησιμοποιείτε καμία φιάλη στην οποία έχει παραβιαστεί η ακεραιότητα της αποστειρωμένης συσκευασίας.

Ε.Ε.: Εφαρμόζονται τα τυπικά μέτρα πρόληψης λοιμώξεων από τη χρήση φαρμακευτικών προϊόντων που έχουν παρασκευαστεί από ανθρώπινο αίμα ή πλάσμα και περιλαμβάνουν την επιλογή των δωτών, τη διαλογή μεμονωμένων δωρεών και τη δημιουργία δεξαμενών πλάσματος για συγκεκριμένους δείκτες λοιμώξεων, καθώς και τη συμπερίληψη αποτελεσματικών βημάτων κατά την παρασκευή για την αδρανστοποίηση/αφαίρεση των ιών. Παρόλα αυτά, όταν χορηγούνται φαρμακευτικά προϊόντα που έχουν παρασκευαστεί από ανθρώπινο αίμα ή πλάσμα, δεν είναι δυνατόν να αποκλειστεί εντελώς η πιθανότητα μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων. Αυτό ισχύει επίσης και για άγνωστους ή νεοεμφανιζόμενους ιούς και άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Δεν υπάρχουν αναφορές αποδεδειγμένης μετάδοσης ιών με αλβουμίνη η οποία έχει παρασκευαστεί με τις διαδικασίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, μέσω των καθιερωμένων διαδικασιών. Συνιστάται ιδιαίτερα, κάθε φορά που χορηγούνται μέσα καλλιέργειας προϊόντων και μέσα αναπαραγωγής της Irvine Scientific, LLC σε έναν ασθενή, να καταγράφεται το όνομα και ο αριθμός παρτίδας του προϊόντος, ώστε να διατηρείται ένας σύνδεσμος μεταξύ του ασθενούς και της παρτίδας του προϊόντος.

Η.Π.Α.: Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA). Το υλικό ανθρώπινης προέλευσης το οποίο χρησιμοποιείται στην παρασκευή του προϊόντος αυτού έχει ελεγχθεί με ενεργημένα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) kit και έχει βρεθεί ότι δεν αντιδρά σε αντισώματα κατά του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) και σε αντισώματα κατά του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Ωστόσο, καμία μεθοδολογία ελέγχου δεν προσφέρει πλήρη διασφάλιση ότι τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης δεν είναι μολυσματικά. Ο χειρισμός όλων των υλικών ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να γίνεται σαν να είναι δυνατόν να μεταδώσουν λοιμώξη, εφαρμόζοντας γενικές προφυλάξεις. Οι δότες του αρχικού υλικού έχουν επίσης εξεταστεί για νόσο Creutzfeldt-Jakob (CJD).

ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΗ

Το προϊόν περιέχει βενική γενταμικίνη. Θα πρέπει να λαμβάνονται οι απαραίτητες προφυλάξεις για να διασφαλιστεί ότι ο ασθενής δεν έχει ευαισθησία στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

UPOZORNĚNÍ PRO EU: Pouze pro profesionální použití.

INDIKACE PRO POUŽITÍ

Vit Kit-Thaw (vitřifikční rozmrazovací souprava) je určena k použití při rozmrazování vitřifikovaných oocytů (MI), pronukleárních (PN) zygot do úrovně embrya ve stádiu rýhování 3. dne a embryí ve stádiu blastocysty vitřifikovaných pomocí soupravy Vitřification Freeze Kit (kat. č. 90133-SO).

POPIS PROSTŘEDKU

Roztok **Thawing Solution-TS** je HEPES pufovaný roztok média Medium-199 obsahující gentamicin sulfát, 1,0 M sacharózy a 20 % (v/v) doplňku Dextran Serum Supplement (DSS).

Ředící roztok **Dilution Solution-DS** je HEPES pufovaný roztok média Medium-199 obsahující gentamicin sulfát, 0,5 M sacharózy a 20 % (v/v) DSS.

Promývací roztok **Washing Solution-WS** je HEPES pufovaný roztok média Medium-199 obsahující gentamicin sulfát a 20 % (v/v) DSS.

DSS je přípravek k suplementaci proteinů a sestává z 50 mg/ml lidského sérového albuminu (HSA) terapeutické kvality a 20 mg/ml dextranu. DSS se v soupravě Vit Kit-Thaw používá při 20 % (v/v) k dosažení konečné koncentrace 10 mg/ml HSA a 4 mg/ml dextranu.

Tyto tři roztoky se používají v pořadí podle kroků protokolu ohřívání mikrokapek.

SLOŽENÍ

<u>Soli a ionty</u>	Amid kyseliny nikotinové	<u>Zdroj proteinů</u>	Lysin	Hydroxyprolin
Chlorid sodný	Kyselina pantothenová	Lidský sérový albumin	Prolin	Cystin
Fosforečnan sodný	Riboflavin	<u>Pufry</u>	Tyrosin	<u>Ostatní</u>
Chlorid draselný	Pyridoxin	Hydrogenuhlíčitán sodný	Alanin	Guanin
Síran hořečnatý	Thiamin	HEPES	Kyselina asparagová	Hypoxantin
Octan sodný	Biotin	<u>Indikátor pH</u>	Kyselina glutamová	Thymin
Chlorid vápenatý	Alfa-tokoferol	Fenolová červeně	Isoleucin	Uracil
Dusičnan železitý	Hydrogensířičtan sodný	<u>Makromolekuly</u>	Leucin	Xantin
Cholinchlorid	<u>Antioxidant</u>	Sacharóza	Methionin	Adenosin
<u>Vitaminy a minerály</u>	Glutathion	Dextran	Fenylalanin	Adeninsulfát
Kyselina askorbová	<u>Antibiotikum</u>	<u>Aminokyseliny</u>	Serin	Deoxyribóza
Kyselina aminobenzoová	Gentamicin-sulfát	Arginin	Threonin	Ribóza
Kalciferol	<u>Energetické substráty</u>	Glycin	Tryptofan	<u>Voda</u>
Kyselina listová	Glukóza	Histidin	Valin	V kvalitě vody pro injekci
Kyselina nikotinová	Inositol		Cystein	

ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

Roztoky soupravy Vit Kit-Thaw jsou filtrovány přes membránu a asepticky zpracovány validovanými výrobními metodami.

Na každé šarži Vit Kit-Thaw se provádějí tyto testy:

Roztoky:

- na endotoxiny testem Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)
- test na myších embryích (jednobuněčné při ≥ 80 % expandované blastocystě)
- na sterilitu aktuálně používaným testem na kontrolu sterility podle lékopisu USA <71> (úspěch)

Všechny výsledky jsou uvedeny v analytickém certifikátu k příslušné šarži, který je k dispozici na vyžádání.

PRO OHŘEV TYČINKY CRYOTIP JAKO NOSIČE:

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Konektor (kat. č. 40736) nebo adaptér
- Sterilní Petriho misky (50 × 9 mm, Falcon 351006 nebo ekvivalentní)
- Jednorázové rukavice
- Stříkačka Hamilton GASTIGHT® (50 μ l), kat. č. 80901
- Transferové pipety (skleněné pipety z taženého skla nebo mikropipetové hroty s vnitřním průměrem hrotu ~200 μ m)
- Pinzeta
- Stopky nebo časovač
- Nádoba na kapalný dusík (Dewarova nádoba nebo nádoba z pěnového polystyrenu s víkem, objem 1–2 l)
- Kapalný dusík (objem postačující k dosažení hloubky 4 palců [10 cm] v nádobě)
- Ostré nůžky (sterilní)
- Vodní lázeň 37 °C
- Kultiční médium s proteinem, před rozmrazováním předem ekvilibrované na 37 °C v CO₂ inkubátoru
- Inkubátor o teplotě 37 °C bez CO₂ nebo ohřívací stolek

NÁVOD K POUŽITÍ

Složky soupravy Vit Kit-Thaw (na aplikaci):

- 50 μ l rozmrazovacího roztoku – TS
- 50 μ l ředícího roztoku – DS
- 100 μ l promývacího roztoku – WS
- 1 konektor

PROTOKOL OHŘÍVÁNÍ

(PRO OOCYTY A EMBRYA):

POZNÁMKA: Postupy se provádějí při pokojové teplotě (20–27 °C). Pro níže uvedené postupy NEPOUŽÍVEJTE vyhřívaný stolek mikroskopu.

POZOR: Při manipulaci v rozmrazovacích roztocích minimalizujte expozici vzorku světlu.

- Před ohříváním vitrifikovaných vzorků nechte potřebné množství TS, DS a VS dosáhnout pokojové teploty (20–27 °C).
POZNÁMKA: Nenechte celé lahvičky TS, DS a VS opakovaně zahřívat na pokojovou teplotu, pokud budete potřebovat vždy jen malé množství těchto roztoků. Lepší je odměřit množství, které se má použít, a lahvičky po odměření ihned vrátit do prostoru o teplotě 2–8 °C.
- Naplněte nádobu na kapalný dusík kapalným dusíkem (přibližně do 80 %) a umístěte do blízkosti mrazničky s LN₂ se vzorky určenými k rozmrazení.
- Vyjmete držáky se zásobníky obsahujícími tyčinky CryoTip s vitrifikovanými vzorky ze skladovacího prostoru s tekutým dusíkem a přeneste je do nádoby naplněné kapalným dusíkem.
POZOR: Dbejte, aby tyčinky CryoTip během přenosu ze skladovacího prostoru do nádoby s LN₂ zůstaly ponořené v LN₂ (v zásobníku), aby nedošlo k nekontrolovanému rozmrazení vzorků.
Nádobu umístěte poblíž mikroskopu k rychlé manipulaci.
- Vyznačte nezbytné informace na štítku sterilní Petriho misky (nebo víčka).
- Opatrným dvojitým převrácením promíchejte před použitím obsah každé lahvičky TS, DS a VS.
- Postup přípravy misky s kapičkami roztoků pro protokol ohřívání:
Asepticky na obrácené víčko sterilní Petriho misky nakapejte 2 mikrokapky po sobě podle ilustrace na obr. 1 a misku umístěte na stolek mikroskopu:
 - jednu 50 µl kapku TS
 - jednu 50 µl kapku DS
 - (dvě kapky WS se připraví později, v kroku 11)
- Umístěte vodní lázeň o teplotě 37 °C do blízkosti mikroskopu. Mějte po ruce: transferovou pipetu a hroty, sterilní ostré nůžky, stříkačku Hamilton a sterilní utěrky.
- Pinzetou (nebo kleštěmi) vyjměte danou tyčinku CryoTip z držáku v kapalném dusíku, rychle ji ponořte do vodní lázně (≥ 500 ml) o teplotě 37 °C a opatrně s ní po dobu 3 vteřin otáčejte, aby se ohřála (viz obr. 2) rychlostí +24 000 °C/min.
- Rychle vykapněte obsah tyčinky CryoTip tímto postupem (viz obr. 3):
 - Tyčinku CryoTip rychle do sucha otřete sterilní utěrkou.
 - Odstraňte kovový ochranný kryt.
 - Přestřihněte svar na silném konci tyčinky CryoTip u značky č. 4.
 - Pomocí konektoru nebo adaptéru pevně připojte široký konec tyčinky CryoTip ke stříkačce Hamilton nebo vhodnému aspiračnímu nástroji.**POZNÁMKA:** Před připojením stříkačky ke konektoru a tyčince CryoTip povytáhněte píst stříkačky přibližně o 0,5 palce (1,3 cm).
 - Opatrně sterilní utěrkou do sucha otřete jemný hrot.
 - Držte tyčinku CryoTip nad připravenou rozmrazovací miskou, rychle přestřihněte svar na značce č. 2 na straně jemného hrotu a vykapněte obsah tyčinky CryoTip jako malou kapku (~ 1 µl) na suché místo na misce nad kapkou roztoku TS (viz obr. 4).**POZNÁMKA: PŘI VYKÁPNUTÍ OBSAHU NENECHTE TVORIT BUBLINKY.**
- Připojte kapku TS k obsahu tyčinky CryoTip a nechte po dobu 1 minuty postupně promísit (viz obr. 4).
Poznámka: Vzorky se smrští a vyplavou na povrch kapky.
POZNÁMKA: Po každém přenosu vzorku (vzorků) vyfoukněte případnou zbývající kapalinu z transferové pipety a před další manipulací natáhněte část roztoku z další kapky. Při přenášení dbejte, aby se netvořily bublinky.
- Natáhněte do transferové pipety trochu DS a na 4 minuty přeneste vzorek (vzorky) z kapky TS s minimálním obsahem tohoto roztoku do kapky DS.
POZNÁMKA: Vzorek při expozici DS zůstane smrštěný.
BĚHEM TĚTO FÁZE PŘIPRAVTE DVĚ 50 µl KAPKY WS (WS1 A WS2), VIZ OBR. 4.
- Na 4 minuty přeneste vzorek (vzorky) do kapky WS (WS1).
- POZNÁMKA:** Vzorek (vzorky) by měl(y) po 2–3 minutách ve WS znovu expandovat do původní velikosti.
- Potom na 4 minuty vzorek (vzorky) přeneste do druhé kapky WS (WS2).
- Před další manipulací přeneste ohřátý (ohřáté OOCYTY) do předem ekvilibrovaného kultivačního média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml) pro obnovení (na 2–3 hodiny, aby se umožnilo opakované vytvoření vřetěnka).
Pro ohřáté EMBRYO (EMBRYA) existují dvě možnosti:
 - Okamžitý přenos do těla pacientky: přeneste EMBRYO (EMBRYA) do předem ekvilibrovaného přenosového média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml).
 - Další kultivace: přeneste EMBRYO (EMBRYA) do předem ekvilibrovaného kultivačního média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml) na dobu 4 hodin pro obnovení. Po době obnovení přeneste EMBRYO (EMBRYA) do kultivačního média s 10 % (v/v) proteinu a příslušně inkubujte, dokud není dosaženo požadované fáze vývoje pro přenos do těla pacientky.

PRO OHŘEV KAPILÁRY HSV JAKO NOSIČE:

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Sterilní miska se 4 jamkami (Nunc 179830, 144444 nebo ekvivalentní) nebo miska na orgánové kultury (BD Falcon 353037)
- Jednorázové rukavice
- Transferové pipety
- Pinzeta
- Stopky nebo časovač
- Nádobu na kapalný dusík
- Kapalný dusík
- Nůžky, Knipex nebo jiný nástroj k přestřižení drátů
- Kultivační médium s proteinem, před rozmrazováním předem ekvilibrované na 37 °C v CO₂ inkubátoru
- Inkubátor o teplotě 37 °C bez CO₂ nebo ohřívací stolek

NÁVOD K POUŽITÍ

Složky soupravy Vít Kit-Thaw (na aplikaci)

- 250 µl rozmrazovacího roztoku – TS
- 50 µl ředícího roztoku – DS
- 100 µl promývacího roztoku – WS

PROTOKOL OHŘÍVÁNÍ

(PRO OOCYTY A EMBRYA):

POZNÁMKA: Kroky ohřívání zahrnují ponoření prostředku do TS o teplotě 37 °C a následné ředění a promývání v DS a WS při pokojové teplotě.

1. Připravte ohřívací nádoby (podle schématu pro kapiláru HSV):

- Při teplotě 37 °C: Asepticky aplikujte 250 µl roztoku TS do sterilní 4jamkové misky nebo misky na orgánové kultury a před zahříváním nejméně na 30 minut vložte do inkubátoru bez CO₂ nebo na ohřívací stolek s teplotou 37 °C.

POZNÁMKA: Pro oocyty aplikujte minimálně 1 ml roztoku TS.

2. Identifikujte kapiláru nebo kapiláry HSV skladované v LN₂, které se mají rozmrazit, a rychlým přenesením do nádoby naplněné LN₂ je připravte k rozmrazování.
3. Nádobu s LN₂ umístěte poblíž mikroskopu k rychlé manipulaci.
4. Vyjměte misku s TS z inkubátoru o teplotě 37 °C nebo z ohřívacího stolu, vložte na stolek mikroskopu a zaostřete na ni mikroskop.
5. Povytněte kapiláru tak, aby se odkryla barevná manipulační tyčinka. Dbejte, aby konec se vzorkem (vzorky) zůstal ponořený v LN₂.
6. Nástrojem Knipex (nebo jiným nástrojem k přestřihnutí drátů) přestřihněte kapiláru ve výšce barevné manipulační tyčinky. Červený vodič délky řezání na nástroji Knipex nastavte do polohy pro maximální délku nebo ho odstraňte.
 - Alternativně lze kapilárou otáčet mezi ukazovákem a palcem a přitom stříhat nůžkami, 10 mm pod horní částí barevné manipulační tyčinky.
7. Jedním rychlým, ale kontrolovaným pohybem rychle uchopte manipulační tyčinku a vytáhněte ji z kapiláry.
8. Okamžitě ponořte kanálek do roztoku TS o teplotě 37 °C, jemným kroužením dosáhnete odpojení vzorku z prostředku a ponechte 1 minutu.

Kroky 9–12 se musí provádět při pokojové teplotě (22–27 °C).

- Při pokojové teplotě: Asepticky nadávkuje jednu (1) 50µl kapku DS na sterilní Petriho misku.

9. Natáhněte do transferové pipety trochu DS a na 4 minuty přeneste vzorek (vzorky) z kapky TS s minimálním obsahem tohoto roztoku do kapky DS.

POZNÁMKA: Vzorek při expozici DS zůstane smrštěný.

BĚHEM TĚTO FÁZE PŘIPRAVTE DVĚ 50µl KAPKY WS (WS1 A WS2), VIZ SCHÉMA PRO KAPILÁRU HSV.

10. Na 4 minuty přeneste vzorek (vzorky) do kapky WS (WS1).

POZNÁMKA: Vzorek (vzorky) by měl(y) po 2–3 minutách ve WS znovu expandovat do původní velikosti.

11. Potom na 4 minuty vzorek (vzorky) přeneste do druhé kapky WS (WS2).

12. Před další manipulací přeneste ohřátý OOCYT (ohřáté OOCYTY) do předem ekvilibrovaného kultivačního média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml) pro obnovu (na 2–3 hodiny, aby se umožnilo opakované vytvoření vřeténka).

Pro ohřáté EMBRYO (EMBRYA) existují dvě možnosti:

- a) Okamžitý přenos do těla pacientky: přeneste EMBRYO (EMBRYA) do předem ekvilibrovaného přenosového média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml).
- b) Další kultivace: přeneste EMBRYO (EMBRYA) do předem ekvilibrovaného kultivačního média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml) na dobu 4 hodin pro obnovu. Po době obnovy přeneste EMBRYO (EMBRYA) do kultivačního média s 10% (v/v) proteinu a příslušně inkubujte, dokud není dosaženo požadované fáze vývoje pro přenos do těla pacientky.

POZNÁMKA: Obnovené oocyty musí být pro optimální oplodnění po vitifikaci oplodněny pomocí intracytoplazmické spermiové injekce (ICSI).

PRO OHŘEV SYSTÉMU CRYOLOCK™ JAKO NOSIČE:

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Sterilní miska se 4 jamkami nebo sterilní malé Petriho misky (35 × 10 mm nebo ekvivalentní)
- Jednorázové rukavice
- Transferové pipety
- Stopky nebo časovač
- Nádoba na kapalný dusík
- Kapalný dusík
- Kultivační médium s proteinem, před rozmrazováním předem ekvilibrované na 37 °C v CO₂ inkubátoru
- Inkubátor o teplotě 37 °C bez CO₂ nebo ohřívací stolek
- Kleště

NÁVOD K POUŽITÍ

Složky soupravy Vít Kit-Thaw (na aplikaci)

- 1 ml rozmrazovacího roztoku – TS
- 50 µl ředícího roztoku – DS
- 100 µl promývacího roztoku – WS

PROTOKOL OHŘÍVÁNÍ

POZNÁMKA: Kroky ohřívání zahrnují ponoření prostředku do TS o teplotě 37 °C a následné ředění a promývání v DS a WS při pokojové teplotě.

1. Připravte rozmrazovací misku (viz schéma pro systém Cryolock, obr. 1):

- Při teplotě 37 °C: Asepticky nadávkuje minimálně 1 ml TS a ohřívějte na 37 °C v inkubátoru bez CO₂ nebo na ohřívacím stolek nejméně 30 minut před zahájením postupu ohřívání.

2. Identifikujte vzorek (vzorky) v systému Cryolock k ohřátí a rychlým přenesením s kryomrazničkou s LN₂ do manipulační nádoby vyplněné LN₂ připravte k ohřívání.

3. Manipulační nádobu vyplněnou LN₂ umístěte do bezprostřední blízkosti pracovního prostoru a stolu mikroskopu, aby bylo zajištěno následné rychlé přemístění z nádoby do TS.

4. Vyjměte misku s TS z inkubátoru o teplotě 37 °C nebo z ohřívacího stolu, vložte na stolek mikroskopu a zaostřete na ni mikroskop.

5. Kleštěmi uchopte horní konec těla systému Cryolock tak, aby identifikační štítek směřoval nahoru.

Možnost A: Rychle, ale šetrně odstraňte v LN₂ krytku; otáčejte díly, dokud se neuvolní.

Možnost B: Rychle vyjměte systém Cryolock z LN₂ a potom rychle jemným otočením odstraňte krytku.

POZNÁMKA: Laborať se řídí vlastními postupy a protokoly. Možnost A není schválena k použití v USA.

6. Okamžitě ponořte konkávní hrot systému Cryolock se vzorkem (vzorky) směrem nahoru do roztoku TS o teplotě 37 °C. Pod mikroskopickou kontrolou šetrně systémem Cryolock pohybuje, dokud se vzorek (vzorky) neuvolní z hrotu.

7. Nechte vzorek (vzorky) celkem 1 minutu v TS.

8. Třicet (30) sekund po prvním ponoření šetrně vzorek (vzorky) pipetujte, pokud plavou, a umístěte na dno TS.

Kroky 9–12 se musí provádět při pokojové teplotě (22–27 °C).

- Při pokojové teplotě: Asepticky nadávkujte jednu (1) 50μl kapku DS na sterilní Petriho misku (viz schéma pro systém Cryolock, obr. 2).

9. Na 4 minuty vzorek (vzorky) přeneste do DS. Jednou vzorky šetrně pipetujte, abyste zajistili úplné opláchnutí v DS.

POZNÁMKA: Vzorek při expozici DS zůstane smrštený.

10. Během 4minutové expozice DS asepticky nadávkujte dvě (2) 50μl kapky WS (WS1, WS2) podle ilustrace na nákreсу.

11. Vzorek (vzorky) pokaždé na 4 minuty přeneste do WS1 a pak WS2.

POZNÁMKA: Vzorek (vzorky) by měl(y) po 2–3 minutách ve WS znovu expandovat do původní velikosti.

12. Před další manipulací přeneste ohřátý OOCYT (ohřáté OOCYTY) do předem ekvilibrovaného kultivačního média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml) pro obnovení (na 2–3 hodiny, aby se umožnilo opakované vytvoření vřeténka).

Pro ohřáté EMBRYO (EMBRYA) existují dvě možnosti:

- a) Okamžitý přenos do těla pacientky: přeneste EMBRYO (EMBRYA) do předem ekvilibrovaného přenosového média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml).
- b) Další kultivace: přeneste EMBRYO (EMBRYA) do předem ekvilibrovaného kultivačního média s 20% (v/v) doplňkem proteinů (12 mg/ml) na dobu 4 hodin pro obnovení. Po době obnovení přeneste EMBRYO (EMBRYA) do kultivačního média s 10 % (v/v) proteinu a příslušně inkubujte, dokud není dosaženo požadované fáze vývoje pro přenos do těla pacientky.

Další informace o použití těchto výrobků každá laborať získá ve vlastních laboratorních metodách a protokolech vypracovaných a optimalizovaných specificky pro její konkrétní zdravotnický program.

POKYNY PRO UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Neotevřené lahvičky uchovávejte v chladničce při teplotě od 2 °C do 8 °C. Při doporučeném skladování jsou roztoky soupravy Vitrification Thaw Kit stabilní do dat expirace uvedených na štítcích lahviček.

Média po otevření nádobek nepoužívejte déle než osm (8) týdnů.

Jelikož výrobek obsahuje lidský zdrojový materiál, mohou se v něm při skladování objevit částice. Není známo, že by tento typ částic měl vliv na funkci výrobku.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

Tento prostředek je určen k použití pracovníky školenými v postupech asistované reprodukce. Tyto postupy zahrnují použití, k němuž je tento prostředek určen.

Za sledovatelnost prostředku a dodržování platných státních předpisů týkajících se sledovatelnosti odpovídá podle situace zdravotnické zařízení, v němž je prostředek používán.

Nepoužívejte žádnou lahvičku s roztokem, která vykazuje známky poškození, netěsnosti, částic, zakalení nebo změny zabarvení. Výrobek zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.

Aby se zabránilo problémům s kontaminací, dodržujte při manipulaci aseptické postupy.

Odborná literatura aktuálně uvádí, že dlouhodobé účinky vitifikace na oocyty a embrya nejsou dosud známy.

Nepoužívejte žádnou lahev s poškozeným sterilním balením.

EU: Standardní opatření k prevenci infekcí následkem používání léčivých přípravků získávaných z lidské krve nebo plazmy zahrnují výběr dárců, screening jednotlivých darovaných produktů a sdružené plazmy na přítomnost specifických markerů infekcí a zařazení účinných kroků k inaktivaci/odstranění virů do výrobního postupu. Navzdory tomu nelze možnost přenosu infekčních činitelů u léčivých přípravků získávaných z lidské krve nebo plazmy zcela vyloučit. To se také týká neznámých či nově objevovaných virů a jiných patogenů. U albuminu vyráběného zavedenými postupy podle specifikací Evropského lékopisu nebyly hlášeny žádné případy prokázání přenosu virů. Pokaždé, když je pacientce podáno kultivační médium ze sortimentu reprodukčních médií Irvine Scientific, LLC, důrazně doporučujeme zapsat jeho název a číslo šarže, aby byla zachována souvztažnost mezi pacientkou a šarží přípravku.

USA: Tento výrobek obsahuje lidský sérový albumin (HSA). Lidský zdrojový materiál použitý k přípravě tohoto výrobku byl testován soupravami schválenými FDA a sledán nereaktivním vůči protilátkám proti viru hepatitidy C (HCV) a viru lidské imunodeficiency (HIV). Žádná zkušební metoda však nemůže zcela zaručit, že přípravky získávané z lidských zdrojů nejsou infekční. Proto se všemi materiály z lidských zdrojů zacházejte, jako by u nich byla možnost přenosu infekce, a zachovávejte obvyklá preventivní opatření. Dárci zdrojového materiálu také prošli screeningem na Creutzfeldt-Jakobovu nemoc.

KONTRAINDIKACE

Výrobek obsahuje gentamicin-sulfát. Vhodným preventivním postupem ověřte, že pacientka není senzitivní na toto antibiotikum.

REGLER FOR EU: Kun til professionel brug.

INDIKATIONER FOR ANVENDELSE

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) er beregnet til brug til optøning af vitrificerede humane oocytter (MI), pronukleære (PN) zygoter til dag 3 embryoner på cleavage stadiet og embryoner på blastocyststadiet, som er blevet vitrificeret ved anvendelse af Vitrification Freeze Kit (katalognr. 90133-SO)

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

Thawing Solution-TS er en HEPES-bufferet opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat, 1,0 M sakkarose og 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS er en HEPES-bufferet opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat, 0,5 M sakkarose og 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS er en HEPES-bufferet opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat og 20 % (v/v) DSS.

DSS er et proteinsupplement bestående af 50 mg/ml humant serumalbumin (HSA) af behandlingsmæssig kvalitet og 20 mg/ml dextran. DSS anvendes ved 20 % (v/v) i Vit Kit-Thaw for at få en endelig koncentration på 10 mg/ml HSA og 4 mg/ml dextran.

Disse tre opløsninger skal anvendes i rækkefølge iht. den trinvis protokol for opvarmning af mikrodråber.

SAMMENSÆTNING

<u>Salte og ioner</u>	Nikotinsyreamid	<u>Proteinkilde</u>	Prolin	<u>Andet</u>
Natriumklorid	Pantothenyre	Humant serumalbumin	Tyrosin	Guanin
Natriumfosfat	Riboflavin	<u>Buffere</u>	Alanin	Hypoxanthin
Kaliumklorid	Pyridoxin	Natriumbikarbonat	Asparaginsyre	Thymin
Magnesiumsulfat	Thiamin	HEPES	Glutaminsyre	Uracil
Natriumacetat	Biotin	<u>pH-indikator</u>	Isoleucin	Xanthin
Kalciumklorid	Alfa-tokoferol	Rød fenol	Leucin	Adenosin
Ferrinitrat	Natriumbisulfid	<u>Makromolekyler</u>	Methionin	Adeninsulfat
Kolinklorid	<u>Antioxidant</u>	Sakkarose	Phenylalanin	Deoxyribose
<u>Vitaminer og mineraler</u>	Glutathion	Dextran	Serin	Ribose
Ascorbinsyre	<u>Antibiotikum</u>	<u>Aminosyrer</u>	Threonin	<u>Vand</u>
Aminobenzoesyre	Gentamicinsulfat	Arginin	Tryptofan	Af kvalitet til
Calciferol	<u>Energisubstrater</u>	Glycin	Valin	injektionsvæske
Folinsyre	Glukose	Histidin	Cystein	
Nikotinsyre	Inositol	Lysin	Hydroxyprolin	
			Cystin	

KVALITETSSIKRING

Opløsningerne i Vit Kit-Thaw er membranfiltreret og aseptisk fremstillet iht. validerede procedurer.

Hvert parti Vit Kit-Thaw undergår følgende test:

Opløsninger:

Endotoxin med Limulus Amebocyte Lysate- (LAL) metoden ($\leq 0,6$ EU/ml)

Analyse af museembryo (éncellet) (ved ≥ 80 % ekspanderet blastocyst)

Sterilitet med den aktuelle USP-sterilitetstest <71> (bestået)

Alle resultater rapporteres på et partispecifikt analysecertifikat (Certificate of Analysis), som kan fås efter anmodning.

OPVARMNING AF CRYOTIP SOM BÆRER:

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Konnektor (katalognr. 40736) eller adapter
- Sterile petriskåle (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller tilsvarende)
- Engangshandsker
- Hamilton GASTIGHT® sprøjte (50 µl, katalognr. 80901)
- Transferpipetter (glaspipetter eller mikropipettespidser med en indvendig diameter i spidsen på ~200 µm)
- Pincet
- Stopur eller timer
- Beholder til flydende nitrogen (Dewar- eller Styrofoam-beholder med låg, 1-2 l volumen)
- Flydende nitrogen (tilstrækkelig volumen til at opnå en dybde på 4 tommer (10 cm) i beholderen)
- En skarp saks (steril)
- 37 °C vandbad
- Dyrkningsmedium med protein, præ-ækvilibreret til 37 °C i CO₂-inkubator inden optøningsproceduren.
- 37 °C inkubator uden CO₂ eller varmeplade.

BRUGSANVISNING

Vit Kit-Thaw-komponenter (pr. applikation):

- 50 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS
- 1 konnektor

PROTOKOL FOR OPVARMNING

(FOR OOCYTTER OG EMBRYONER):

- BEMÆRK: Procedurene skal udføres ved stuetemperatur (20-27 °C). BRUG IKKE et mikroskop med opvarmet objektbord til følgende procedurer.
- FORSIGTIG: Minimer udsættelse af prøver for lys under håndtering i optøningsopløsninger.
- Bring den mængde TS, DS og WS, der skal anvendes, til stuetemperatur (20-27 °C) inden opvarmning af de vitrificerede prøver.
BEMÆRK: Undgå at bringe hele hætteglassene med TS, DS og WS til stuetemperatur gentagne gange, da der kun er brug for en del af opløsningen hver gang. Det er bedre at udportionere den mængde, der skal bruges, og bringe hætteglassene tilbage til 2-8 °C lige efter udportionering.
 - Fyld nitrogenbeholderen med flydende nitrogen (~80 % fuld) og sæt den ved siden af den LN₂-fryser, der indeholder de prøver, der skal optes.
 - Fjern kryoholderne med bægre, der indeholder CryoTips med vitrificerede prøver, fra opbevaringen i flydende nitrogen, og overfør dem til beholderen fyldt med flydende nitrogen.
FORSIGTIG: Sørg for, at CryoTips forbliver nedsænket i LN₂ (i bægeret) under overførsel fra opbevaring til LN₂-beholderen for at forhindre ukontrolleret optøning af prøverne.
Anbring beholderen tæt på mikroskopet med henblik på hurtig manipulation.
 - Sæt en etiket med de nødvendige oplysninger på en steril petriskål (eller låget).
 - Vend forsigtigt hvert hætteglas med TS, DS og WS op og ned to gange for at blande indholdet inden brug.
 - Forbered skålen med dråber af opløsning til opvarmningsprotokollen på følgende måde:
Dispenser aseptisk en sekvens af 2 mikrodåber på et omvendt låg af en steril petriskål som vist i figur 1, og placer skålen på mikroskopets objektbord:
 - en 50 µl dråbe TS
 - en 50 µl dråbe DS
 - (To dråber WS vil blive sat op senere på trin 11)
 - Anbring vandbadet på 37 °C tæt på mikroskopet. Hav følgende ved hånden: En transferpipette og spidser, en steril skarp saks, en Hamilton-sprøjte og sterile servietter.
 - Brug en pincet (eller tang), og tag den specifikke CryoTip ud af holderen i flydende nitrogen. Nedsænk hurtigt CryoTip i vandbadet på 37 °C (> 500 ml), og hvirl forsigtigt i 3 sekunder for at opvarme (se figur 2) ved +24.000 °C/min.
 - Dispenser hurtigt indholdet af CryoTip på følgende måde (se figur 3):
 - Tør hurtigt CryoTip med en steril serviet
 - Fjern beskyttelsesmanchetten af metal
 - Bryd forseglingen på den brede ende af CryoTip ved mærke nr. 4
 - Sæt den brede ende af CryoTip fast på Hamilton-sprøjten eller et passende aspirationsredskab ved hjælp af en konnektor eller en adapter.
BEMÆRK: Løft sprøjtestemplet ca. 0,5 tomme (1,3 cm) op, inden sprøjten sluttes til konnektoren og CryoTip.
 - Tør forsigtigt den tynde spids med en steril serviet.
 - Hold CryoTip over den forberedte optøningsskål, og bryd hurtigt forseglingen på mærke nr. 2 for enden af den tynde spids.
Dispenser indholdet af CryoTip som en lille dråbe (~ 1 µl) på et tørt område i skålen over TS-dråben (se figur 4).
BEMÆRK: UNDGÅ DANNELSE AF BOBLER, NÅR INDHOLDET DISPENSERES.
 - Lad TS-dråben flyde sammen med CryoTip-indholdet, og tillad gradvis blanding i 1 minut (se figur 4).
Bemærk: Prøverne vil skrumpe og flyde op til toppen af dråben.
BEMÆRK: Efter hver overførsel af prøven/prøverne skal overskydende væske pustes ud af transferpipetten, og noget opløsning fra den næste dråbe skal trækkes op inden næste manipulation. Undgå dannelsen af bobler under overførslerne.
 - Træk noget DS op i transferpipetten, og overfør prøven/prøverne fra TS-dråben med minimal volumen til dråben af DS i 4 minutter.
BEMÆRK: Prøven forbliver indskrumpet under eksponering for DS.
PÅ DETTE TIDSPUNKT ANBRINGES DE TO 50 µl DRÅBER AF WS (WS1, WS2), SOM VIST I FIGUR 4.
 - Overfør prøven/prøverne til dråben af WS (WS1) i 4 minutter.
BEMÆRK: Prøven/prøverne skal igen udvide sig til den oprindelige størrelse inden for 2-3 minutter i WS.
 - Overfør derefter prøven/prøverne til den anden dråbe af WS (WS2) i 4 minutter.
 - Overfør opvarmet/opvarmede OOCYT(TER) til præ-ekvilibreret dyrkningsmedium med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml for restitution (2-3 timer for at give tid til gendannelse af spindlen) forud for videre manipulation
Der er to muligheder for opvarmet/opvarmede EMBRYON(ER):
 - a) For omgående overførsel til patient: Overfør EMBRYON(ER) til præ-ekvilibreret 'overførselsmedium' med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml.
 - b) For yderligere dyrkning: Overfør EMBRYON(ER) til præ-ekvilibreret dyrkningsmedium med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml med henblik på en restitutionsperiode på 4 timer. Efter restitutionsperioden overføres EMBRYONET/EMBRYONERNE til dyrkningsmedium med 10 % (v/v) protein, og der inkuberes, indtil det ønskede udviklingsstadium for overførsel til patient er nået.

OPVARMNING AF HSV-KOMPONENTEN SOM BÆRER:

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Steril skål med 4 brønde (Nunc 179830, 144444 eller tilsvarende) eller skål til vævsdyrkning (BD Falcon 353037)
- Engangshandsker
- Transferpipetter
- Pincet
- Stopur eller timer
- Beholder til flydende nitrogen
- Flydende nitrogen
- Saks, Knipex-tang eller andet skæreværktøj til tråd
- Dyrkningsmedium med protein, præ-ekvilibreret til 37 °C i CO₂-inkubator inden optøningsproceduren
- 37 °C inkubator uden CO₂ eller varmeplade

BRUGSANVISNING

Vit Kit-Thaw-komponenter (pr. applikation)

- 250 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

PROTOKOL FOR OPVARMNING

(FOR OOCYTTER OG EMBRYONER):

BEMÆRK: Opvarmningstrinnene inkluderer nedsænkning af produktet i den 37 °C varme TS og efterfølgende fortynding og oprensning i DS og WS ved stuetemperatur.

1. Sæt opvarmningsskåle op (som vist på diagrammet over HSV-komponenten):
 - Ved 37 °C: Brug aseptisk teknik og dispenser 250 µl TS i en steril skål med 4 brønde eller en dyrkningsskål, og placer den i en 37 °C inkubator uden CO₂ eller på en varmeplade mindst 30 minutter før opvarmningsproceduren
- BEMÆRK: For oocytter dispenseres mindst 1 ml TS
2. Identifier de(t) HSV-strå, der skal opvarmes, fra opbevaring i LN₂, og overfør dem hurtigt til beholderen fyldt med LN₂ som klargøring for optøningsproceduren.
3. Anbring LN₂-beholderen tæt på mikroskopet med henblik på efterfølgende hurtig manipulation.
4. Fjern skålen med TS fra den 37 °C varme inkubator eller varmeplade, og sæt den i fokus på objektbordet på mikroskopet.
5. Løft strået nok til, at den farvede håndteringsstav eksponeres. Sørg for, at enden med prøven/prøverne forbliver nedsænket i LN₂.
6. Brug en Knipex-tang (eller andet skæreværktøj til tråd) til at klippe strået over på højde med den farvede håndteringsstav. Den røde skærelængdevejledning på Knipex-tangen skal enten stilles til maksimal længde eller fjernes.
 - Brug alternativt fingrene til at dreje strået, mens der laves klippebevægelser med saksen 10 mm under toppen af den farvede håndteringsstav.
7. Tag med en hurtig, men kontrolleret bevægelse fat om håndteringsstaven, og træk den ud af strået.
8. Læg straks enden med prøverne ned i 37 °C TS og hvirvl den forsigtigt rundt for at løse prøverne fra komponenten. Lad den blive i 1 minut.

Trin 9-12 skal udføres ved stuetemperatur (22-27 °C).

- Ved stuetemperatur: Dispenser aseptisk en (1) 50 µl dråbe DS på en steril petriskål
9. Træk noget DS op i transferpipetten, og overfør prøven/prøverne fra TS-dråben med minimal volumen til dråben af DS i 4 minutter.
BEMÆRK: Prøven forbliver indskrumpet under eksponering for DS.
PÅ DETTE TIDSPUNKT ANBRINGES DE TO 50 µl DRÅBER AF WS (WS1, WS2) SOM VIST I DIAGRAMMET OVER HSV-KOMPONENTEN.
 10. Overfør prøven/prøverne til dråben af WS (WS1) i 4 minutter.
BEMÆRK: Prøven/prøverne skal igen udvide sig til den oprindelige størrelse inden for 2-3 minutter i WS.
 11. Overfør derefter prøven/prøverne til den anden dråbe af WS (WS2) i 4 minutter.
 12. Overfør opvarmet/opvarmede OOCYT(TER) til præ-ekvilibreret dyrkningsmedium med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml for restitution (2-3 timer for at give tid til gendannelse af spindlen) forud for videre manipulation
- Der er to muligheder for opvarmet/opvarmede EMBRYON(ER):
- a) For omgående overførsel til patient: Overfør EMBRYON(ER) til præ-ekvilibreret 'overførselsmedium' med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml.
 - b) For yderligere dyrkning: Overfør EMBRYON(ER) til præ-ekvilibreret dyrkningsmedium med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml med henblik på en restitutionperiode på 4 timer. Efter restitutionperioden overføres EMBRYONET/EMBRYONERNE til dyrkningsmedium med 10 % (v/v) protein, og der inkuberes, indtil det ønskede udviklingsstadium for overførsel til patient er nået.

BEMÆRK: Restituerede oocytter skal fertiliseres vha. intracytoplasmatiske sperminjektion (ICSI) for optimal fertilisering efter vitrifikation.

OPVARMNING AF CRYOLOCK™ SOM BÆRER:

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Steril skål med 4 brønde eller sterile små petriskåle (35 X 10 mm eller tilsvarende)
- Engangshandsker
- Transferpipetter
- Stopur eller timer
- Beholder til flydende nitrogen
- Flydende nitrogen
- Dyrkningsmedium med protein, præ-ekvilibreret til 37 °C i CO₂-inkubator inden optøningsproceduren
- 37 °C inkubator uden CO₂ eller varmeplade
- Pincet

BRUGSANVISNING

Vit Kit-Thaw-komponenter (pr. applikation)

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

PROTOKOL FOR OPVARMNING

BEMÆRK: Opvarmningstrinnene inkluderer nedsænkning af produktet i den 37 °C varme TS og efterfølgende fortynding og oprensning i DS og WS ved stuetemperatur.

1. Sæt optøningsskålen op (som vist i diagrammet over Cryolock, figur 1):
 - Ved 37 °C: Dispenser aseptisk mindst 1 ml TS, og opvarm til 37 °C i en inkubator uden CO₂ eller på en varmeplade i mindst 30 minutter inden start af opvarmningsproceduren.
2. Identifier de(n) Cryolock-prøve(r), der skal opvarmes, og overfør den/dem hurtigt fra LN₂-opbevaring til en midlertidig beholder fyldt med LN₂ som forberedelse til opvarmningsproceduren.
3. Anbring den midlertidige LN₂-fyldte beholder tæt på mikroskopets arbejdsområde og objektbord med henblik på hurtig manipulation fra beholderen til TS.
4. Fjern skålen med TS fra den 37 °C varme inkubator eller varmeplade, og sæt den i fokus på objektbordet på mikroskopet.

5. Brug pincet til at holde den øvre ende af Cryolock-legemet med identifikationsmærket vendende opad.
Mulighed A: Fjern hurtigt, men forsigtigt låget under LN₂, og drej delene, indtil de adskilles.
Mulighed B: Tag hurtigt Cryolock ud af LN₂, og fjern så hurtigt låget med en forsigtig drejning.
 - BEMÆRK:** Følg laboratoriets egne procedurer og protokoller. Mulighed A er ikke godkendt til brug i USA.
 6. Nedsæk omgående Cryolocks konkave spids i den 37 °C TS med prøven/prøverne vendende opad. Flyt forsigtigt Cryolock under observation med mikroskop, indtil prøven/prøverne frigøres fra spidsen.
 7. Lad prøven/prøverne være i TS i samlet 1 minut.
 8. Tredive (30) sekunder efter den første nedsækning pipetteres prøven/prøverne forsigtigt, hvis de flyder, og placeres på bunden af TS.
Trin 9-12 skal udføres ved stuetemperatur (22-27 °C).
 - Ved stuetemperatur: Dispenser aseptisk en (1) 50 µl dråbe DS på en steril petriskål (se diagrammet over Cryolock, figur 2).
 9. Overfør prøven/prøverne til DS i 4 minutter. Pipetter prøverne forsigtigt en gang for at sikre fuldstændig skylning i DS.
 - BEMÆRK:** Prøven forbliver indskrumpet under eksponering for DS.
 10. Under de 4 minutters eksponering i DS dispenseres to (2) 50 µl dråber WS (WS1, WS2) aseptisk som vist i diagrammet
 11. Overfør prøven/prøverne til WS1 og derefter WS2, 4 minutter i hver, uforstyrret.
 - BEMÆRK:** Prøven/prøverne skal igen udvide sig til den oprindelige størrelse inden for 2-3 minutter i WS.
 12. Overfør opvarmet/opvarmede OOCYT(ER) til præ-ekvilibreret dyrkningsmedium med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml for restitution (2-3 timer for at give tid til gendannelse af spindlen) forud for videre manipulation
- Der er to muligheder for opvarmet/opvarmede EMBRYON(ER):
- a) For omgående overførsel til patient: Overfør EMBRYON(ER) til præ-ekvilibreret 'overførselsmedium' med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml.
 - B) For yderligere dyrkning: Overfør EMBRYON(ER) til præ-ekvilibreret dyrkningsmedium med 20 % (v/v) proteintilskud eller 12 mg/ml med henblik på en restitutionsperiode på 4 timer. Efter restitutionsperioden overføres EMBRYONET/EMBRYONERNE til dyrkningsmedium med 10 % (v/v) protein, og der inkuberes, indtil det ønskede udviklingsstadium for overførsel til patient er nået.
- For yderligere oplysninger om brug af disse produkter skal hvert laboratorium følge sine egne procedurer og protokoller, som er blevet specifikt udviklet og optimeret til laboratoriets eget medicinske program.

ANVISNINGER FOR OPBEVARING OG STABILITET

Uåbnede hætteglas opbevares ved 2-8 °C. Når Vitricification Thaw Kit-opløsninger opbevares som anvist, er de stabile indtil udløbsdatoen på hætteglassenes etiketter.

Medierne må ikke bruges i mere end otte (8) uger, når beholderne er blevet åbnet.

Eftersom der er humant kildemateriale i produktet, kan det udvikle partikler under opbevaring. Denne type partikler vides ikke at have en indvirkning på produktets ydeevne.

FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

Dette produkt er beregnet til brug af personale, der er uddannet i procedurer forbundet med assisteret reproduktion. Disse procedurer inkluderer den anvendelse, som produktet er beregnet til.

Den institution, som bruger produktet, er ansvarlig for at opretholde sporbarheden af produktet og skal, hvor det er muligt, overholde gældende, nationale bestemmelser for sporbarhed.

Anvend ikke et hætteglas med opløsning, der er beskadiget, lækker, indeholder partikler, er uklart eller har skiftet farve. Bortskaf produktet iht. gældende forskrifter.

Undgå problemer med kontamination ved at bruge aseptiske teknikker.

Langtidsvirkningerne af vitrificering af oocytter og embryoner forbliver ukendte ifølge forskningslitteraturen.

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

EU: Standardforanstaltninger til forebyggelse af infektioner, der skyldes brug af lægemidler tilberedt ud fra humant blod eller plasma, inkluderer udvælgelse af donorer, screening af individuelle donationer og plasmapools for specifikke infektionsmarkører og inklusion af effektive fremstillingsprocedurer mhp. inaktivering/fjernelse af vira. På trods af dette kan risikoen for overførsel af smittefarlige stoffer ikke helt udelukkes ved administration af lægemidler, der er tilberedt ud fra humant blod eller plasma. Dette gælder også for ukendte eller nyfremkomne vira og andre patogener. Der foreligger ingen rapporter om dokumenterede virusoverførsler med albumin fremstillet ifølge specifikationerne i Den Europæiske Farmakopé ved hjælp af etablerede processer. Det anbefales kraftigt at registrere produktets navn og batchnummer, hver gang der administreres et dyrkningsmedium fra reproduktionsmedieprodukter fra Irvine Scientific, LLC til en patient. Herved opretholdes tilknytningen mellem patienten og produktbatchen.

USA: Dette produkt indeholder humant serumalbumin (HSA). Humant kildemateriale, som er anvendt til fremstilling af dette produkt, er blevet testet med analysesæt, der er licenseret af FDA (fødevarer- og lægemiddelstyrelsen i USA) og er fundet ikke-reaktivt over for antistoffer mod hepatitis C (HCV) og antistoffer mod human immunodefektvirus (HIV). Ingen testmetode kan imidlertid helt garantere, at produkter, som er afledt af humant kildemateriale, ikke er smittefarlige. Hænder alt humant kildemateriale som værende smittefarligt og overhold de universelle forsigtighedsregler. Donorerne af kildematerialet er også blevet screenet for Creutzfeldt-Jakobs sygdom (CJD).

KONTRAINDIKATION

Dette produkt indeholder gentamicinsulfat. Passende forholdsregler skal overholdes for at sikre, at patienten ikke er sensibiliseret mod dette antibiotikum.

EU-VAROITUS: Vain ammatikäyttöön.

KÄYTTÖAIHE

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) on tarkoitettu käytettäväksi Vitrification Freeze Kit -pakkausta (tuotenro 90133-SO) käyttäen vitrifikoitujen oosyyttien (MI), pronukleaaristen tsygoottien (päivän 3 jakautumisvaiheen alkioihin asti) ja blastokystavaiheen alkoiden sulattamiseen.

LAITTEEN KUVAS

Thawing Solution-TS on HEPES-puskuroitu liuos Medium-199-elatusainetta, joka sisältää gentamysiinisulfaattia, 1,0 M sakkarosia ja 20 % (tilavuus/tilavuus) Dextran Serum Supplement (DSS) -liuosta.

Dilution Solution-DS on HEPES-puskuroitu liuos Medium-199-elatusainetta, joka sisältää gentamysiinisulfaattia, 0,5 M sakkarosia ja 20 % (tilavuus/tilavuus) DSS-liuosta.

Washing Solution-WS on HEPES-puskuroitu liuos Medium-199-elatusainetta, joka sisältää gentamysiinisulfaattia ja 20 % (tilavuus/tilavuus) DSS-liuosta.

DSS on proteiinitäydennys, joka käsittää 50 mg/ml terapeuttista laatua olevaa ihmisen seerumialbumiinia (HSA) ja 20 mg/ml dekstraania. DSS-liuosta käytetään Vit Kit-Thaw -liuoksessa 20-prosenttisena (tilavuus/tilavuus) määränä, jolloin saadaan lopullinen tilavuus 10 mg/ml HSA:ta ja 4 mg/ml dekstraania.

Näitä kolmea liuosta käytetään peräkkäin asteittaisen mikropisaralämmitysmenetelmän mukaan.

KOOSTUMUS

Suolat ja ionit

natriumkloridi

natriumfosfaatti

kaliumpkloridi

magnesiumsulfaatti

natriumasetaatti

kalsiumkloridi

rautaniitraatti

koliinikloridi

Vitamiinit ja mineraalit

askorbiinihappo

aminobentsoiinihappo

kalsiferoli

foolihappo

nikotiinihappo

nikotiinihappoamidi

pankoteenihiippo

riboflaviini

pyridoksiini

tiamiini

biotini

alfatokoferoli

natriumbisulfiitti

Antioksidantit

glutationi

Antibiootit

gentamysiinisulfaatti

Energiasubstraalit

glukoosi

inositoli

Proteiinin lähde

ihmisen seerumialbumiini

Puskurit

natriumbikarbonaatti

HEPES

pH-indikaattori

fenolipuna

Makromolekyylit

sakkarosii

dekstraani

Aminohapot

arginiini

glysiini

histidiini

lysiini

proliini

tyrosiini

alaniini

asparagiinihappo

glutamiinihappo

isoleusiini

leusiini

metioniini

fenyylialaniini

seriini

treoniini

tryptofaani

valiini

kysteiini

hydroksiprolini

kystiini

Muut

guaniini

hypoksantiini

tymiini

urasiili

ksantiini

adenosiini

adeniinisulfaatti

deoksiriboosi

riboosi

Vesi

injektionesteisiin

tarkoitettun veden

laatuinen

LAADUNVARMENNUS

Vit Kit-Thaw -pakkauksen liuokset ovat kalvosuodatettuja ja validoitujen valmistusmenetelmien mukaisesti aseptisesti käsiteltyjä.

Jokaiselle Vit Kit-Thaw -erälle tehdään seuraavat testit:

Liuokset:

endotoksiini Limulus Amebocyte Lysate (LAL) -menetelmällä ($\leq 0,6$ EU/ml)

hiiren alkioääritys (yksi solu) (laajenee ≥ 80 -prosenttisesti blastokysteiksi)

steriliteetti nykyisellä USP-steriliteettikokeella $<71>$ (läpäissyt).

Kaikki koetulokset ilmoitetaan eräkohtaisesti analyysitodistuksella, joka on pyynnöstä saatavissa.

KANTAJANA OLEVAN CRYOTIPIN LÄMMITTÄMINEN:

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

- Liitin (tuotenro 40736) tai sovitin
- Steriilejä petrimaljoja (50 X 9 mm, Falcon 351006 tai vastaava)
- Kertakäyttökäsineitä
- Hamilton GASTIGHT® -ruisku (50 µl) tuotenro 80901
- Siirtopipettejä (vedettyä lasipipettejä tai mikropipettikärkiä, joiden kärjen sisäläpimita on noin 200 µm)
- Pinsetit
- Sekuntikello tai ajastin
- Nestetyypisäiliö (Dewar-astia tai kannellinen styroksiasia, tilavuus 1–2 l)
- Nestetyypä (riittävä määrä 4 tuuman [10 cm:n] syvyyden saavuttamiseksi säiliössä)
- Terävät sakset (steriilit)
- 37 °C:n vesihaude
- Elatusainetta, joka sisältää proteiinia, esitasapainotettu 37 °C:seen CO₂-lämpökaapissa ennen sulatustoimenpidettä
- 37 °C:n lämpökaappi ilman CO₂:ta tai lämmittävä alusta

KÄYTTÖOHJEET

Vit Kit-Thaw -ainesosat (käyttökertaa kohden):

- 50 µl Thawing Solution-TS -liuosta
- 50 µl Dilution Solution-DS -liuosta
- 100 µl Washing Solution-WS -liuosta
- 1 liitin

LÄMMITYSMENETELMÄ

(OOSYYTEILLE JA ALKIOILLE):

- HUOMAUTUS: Toimenpiteet on tehtävä huoneenlämmössä (20–27 °C). Seuraaviin toimenpiteisiin EI SAA käyttää kuumennettua mikroskooppialustaa.
- VAROITUS: Minimoi näytteen altistuminen valolle sulatusluoksissa käsittelyn yhteydessä.
1. Saata käytettävä määrä TS-, DS- ja WS-liuoksia huoneenlämpöiseksi (20–27 °C) ennen vitrifioitujen näytteiden lämmittämistä.
HUOMAUTUS: Vältä koko TS-, DS- ja WS-pullojen saattamista huoneenlämpöisiksi toistuvasti, silloin kun kullakin käyttökerralla tarvitaan vain pieni määrä liuosta. On parempi ottaa yksi erä, joka käytetään, ja palauttaa pulloit 2–8 °C:n lämpötilaan heti erän ottamisen jälkeen.
 2. Täytä nestetyypisäiliö nestetypellä (~80 % täyteen) ja aseta se lähelle nestetyyppipakastinta, jossa sulatettavia näytteitä säilytetään.
 3. Poista kryoputkipidikeet ja kryoputkiastiat, joissa on CryoTip-kapillaaripillit ja vitrifoidut näytteet, nestetyypisäilytyksestä ja siirrä ne nestetyypellä täytettyyn säiliöön.
VAROITUS: Varmista, että CryoTip-kapillaaripillit pysyvät upotettuina nestetyyppeen (kryoputkiastiassa), kun ne siirretään säilytyksestä nestetyypisäiliöön, jotta näytteet eivät pääse sulamaan hallitsemattomasti.
Aseta säiliö mikroskoopin lähelle nopeaa käsittelyä varten.
 4. Merkitse steriili petrimalja (tai kansi) tarvittavilla tiedoilla.
 5. Käännä varovasti kutakin TS-, DS- ja WS-pulloa kaksi kertaa sisällön sekoittamiseksi ennen käyttöä.
 6. Valmistele malja liuospisaroilla lämmitysmenetelmää varten seuraavasti:
Jaa aseptisesti 2 mikropisaraa steriilin petrimaljan käännetylle kannelle, kuten kuvassa 1, ja aseta kansi mikroskooppialustalle:
 - yksi 50 µl:n pisara TS-liuosta
 - yksi 50 µl:n pisara DS-liuosta
 - (kaksi pisaraa WS-liuosta asetetaan myöhemmin vaiheessa 11).
 7. Aseta 37 °C:n vesihaude lähelle mikroskooppia. Varmista, että seuraavat ovat ulottuvilla: siirtopipetti ja kärjet, steriilit terävät sakset, Hamilton-ruisku ja steriilipyyhkeitä.
 8. Pöimi pinsetillä (tai pihdeillä) tietty CryoTip nestetyypessä olevasta kryoputkipidikkeestä, upota CryoTip nopeasti 37 °C:n vesihauteseen (≥ 500 ml) ja pyöritä sitä kevyesti 3 sekunnin ajan sen lämmittämiseksi (ks. kuva 2) nopeudella 24 000 °C/min.
 9. Tyhjennä CryoTip-kapillaaripillin sisältö nopeasti seuraavalla tavalla (ks. kuva 3):
 - Pyyhi CryoTip nopeasti kuivaksi steriilillä pyyhkeellä.
 - Poista metallinen suojaholkki.
 - Leikkaa CryoTipin leveässä päässä merkin 4 kohdalla oleva saumaus.
 - Liitä CryoTip-kapillaaripillin leveä pää tiukasti paikalleen Hamilton-ruiskuun tai soveltuvaan aspirointivälineeseen liittimen tai sovittimen avulla.

HUOMAUTUS: Nosta ruiskun mäntää noin 0,5 tuumaa (1,3 cm) ennen kuin kiinnität ruiskun liittimeen ja CryoTip-kapillaaripilliin.

 - Pyyhi ohut kärki varovasti kuivaksi steriilillä pyyhkeellä.
 - Pidä CryoTip-kapillaaripilliä valmistellun sulatusastian päällä, leikkaa nopeasti saumaus ohuen kärjen merkin 2 kohdalta ja tyhjennä CryoTip-pillin sisältö pienenä pisarana (~1 µl) maljan kuivaan osaan TS-pisaran yläpuolelle (ks. kuva 4).

HUOMAUTUS: VÄLTÄ KUPIEN MUODOSTUMISTA SISÄLLÖN TYHJENTÄMISEN AIKANA.
 10. Yhdistä TS-pisara CryoTip-kapillaaripillin sisällön kanssa ja anna niiden sekoittua vähitellen 1 minuutin ajan (ks. kuva 4).
Huomautus: Näytteet kutistuvat ja nousevat pisaran pinnalle.
HUOMAUTUS: Puhalla siirtopipettiin mahdollisesti jäljelle jäänyt neste ulos kunkin näytteen siirron jälkeen ja vedä hieman liuosta seuraavasta pisarasta ennen seuraavaa käsittelyä. Vältä kuplien muodostumista siirtojen aikana.
 11. Vedä hieman DS-liuosta siirtopipettiin ja siirrä näytteet mahdollisimman pienessä määrässä TS-pisarasta DS-pisaraan 4 minuutin ajaksi.
HUOMAUTUS: Näyte pysyy kutistuneena DS-liuokselle altistumisen ajan.
VALMISTELE TÄNÄ AIKANA KAKSI 50 µl:n WS-PISARAA (WS1, WS2) KUVASSA 4 ESITETTYLLÄ TAVALLA.
 12. Siirrä näytteet WS-pisaraan (WS1) 4 minuutin ajaksi.
HUOMAUTUS: Näytteiden pitäisi laajentua uudelleen alkuperäiseen kokoon 2–3 minuutin WS-liuoksessa olemisen aikana.
 13. Siirrä sitten näytteet toiseen WS-pisaraan (WS2) 4 minuutin ajaksi.
 14. Siirrä lämmitetyt OOSYYTIT esitasapainotettuun viljelyelatusaineeseen, johon on lisätty 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennys tai 12 mg/ml toipumista varten (2–3 tuntia, jotta sukkula ehtii muodostua uudelleen), ennen seuraavia käsittelyjä.
Lämmitetyille ALKIOILLE on kaksi vaihtoehtoa:
 - a) Välitöntä potilaaseen siirtämistä varten: siirrä ALKIO(T) esitasapainotettuun siirtoelatusaineeseen, joka sisältää 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennys tai 12 mg/ml.
 - b) Jatkoviljelyä varten: siirrä ALKIO(T) esitasapainotettuun viljelyelatusaineeseen, joka sisältää 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennys tai 12 mg/ml, 4 tunnin toipumisjakson ajaksi. Siirrä toipumisjakson jälkeen ALKIO(T) viljelyelatusaineeseen, joka sisältää 10 % (tilavuus/tilavuus) proteiinia, ja inkuboi, kunnes on saavutettu haluttu kehitysvaihe potilaaseen siirtämistä varten.

KANTAJANA OLEVAN HSV-LAITTEEN LÄMMITTÄMINEN:

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

- Steriili 4-kuoppainen malja (Nunc 179830, 144444 tai vastaava) tai elinviljelymalja (BD Falcon 353037)
- Kertäyttöäksineitä
- Siirtopipettejä
- Pinsetit
- Sekuntikello tai ajastin
- Nestetyypisäiliö
- Nestetyppeä
- Sakset, Knipex tai muu lankaleikkuri
- Elatusainetta, joka sisältää proteiinia, esitasapainotettu 37 °C:seen CO₂-lämpökaapissa ennen sulatus-toimenpidettä
- 37 °C:n lämpökaappi ilman CO₂-ta tai lämmittävä alusta

KÄYTTÖOHJEET

Vit Kit-Thaw -ainesosat (käyttökertaa varten)

- 250 µl Thawing Solution-TS -liuosta
- 50 µl Dilution Solution-DS -liuosta
- 100 µl Washing Solution-WS -liuosta

LÄMMITYSMENETELMÄ

(OOSYTEILLE JA ALKIOILLE):

- HUOMAUTUS: Lämmitysvaiheet sisältävät laitteen upottamisen 37 °C:n TS-liuokseen ja sen jälkeen laimentamisen ja pesemisen DS- ja WS-liuoksella huoneenlämmössä.
- Valmistele lämmitysmaljat (HSV-laitteen kaaviokuvasssa näytetyllä tavalla):
 - 37 °C:ssa: Jaa aseptisesti 250 µl TS-liuosta steriilille 4-kuoppaiselle levyille tai elinviljelymaljaan ja aseta se 37 °C:n lämpökaappiin, jossa ei ole CO₂-ta, tai lämmitysalustalle vähintään 30 minuuttia ennen lämmitystoimenpidettä.
 - HUOMAUTUS: Annostele oosyyteille vähintään 1 ml TS-liuosta.
 - Valitse lämmitettävät HSV Straw -kapillaaripillit nestetyppisäilytyksestä ja siirrä ne nopeasti nestetypellä täytettyyn säiliöön valmisteluna sulatustoimenpidettä varten.
 - Aseta nestetyppisäiliö mikroskoopin lähelle myöhemmää nopeaa käsittelyä varten.
 - Poista TS-malja 37 °C:n lämpökaapistä tai lämmitysalustasta ja aseta mikroskooppialustan päälle fokuksen.
 - Nosta kapillaaripillit tarpeeksi saadaksesi esiin värillisen käsittelysauvan. Varmista, että loppupää, jossa näyte on, pysyy nestetypen sisällä.
 - Leikkaa Knipexillä (tai muulla lankaleikkurilla) kapillaaripilli värillisen käsittelysauvan korkeudelta. Knipexissä oleva punainen leikkauspuutteen ohjain tulisi asettaa enimmäispituuden asentoon tai poistaa.
 - Vaihtoehtoisesti voit pyörittää kapillaaripillillä sormilla ja peukalolla ja leikata samalla saksilla 10 mm värillisen käsittelysauvan yläreunan alapuolelta.
 - Käytä yhtä nopeaa, mutta hallittua liikettä ja tartu nopeasti käsittelysauvaan ja vedä se ulos kapillaaripillistä.
 - Upota heti näytteen sisältävä ura TS-liuokseen (37 °C) ja pyöritä varovasti irrottaaksesi näytteet laitteesta. Jätä se 1 minuutiksi.
- Vaiheet 9–12 on tehtävä huoneenlämmössä (22–27 °C).
- Huoneenlämmössä: Jaa aseptisesti yksi (1) 50 µl:n pisara DS-liuosta steriilille petrimaljalle.
 - Vedä hieman DS-liuosta siirtopipettiin ja siirrä näytteet mahdollisimman pienessä määrässä TS-pisarasta DS-pisaraan 4 minuutin ajaksi.
- HUOMAUTUS: Näyte pysyy kutistuneena DS-liuokselle altistumisen ajan.
- VALMISTELE TÄNÄ AIKANA KAKSI 50 µl:n WS-PISARAA (WS1, WS2) HSV-LAITTEEN KAAVIOKUVASSA ESITETTYLLÄ TAVALLA.
- Siirrä näytteet WS-pisaraan (WS1) 4 minuutin ajaksi.
- HUOMAUTUS: Näytteiden pitäisi laajentua uudelleen alkuperäiseen kokoon 2–3 minuutin WS-liuoksessa olemisen aikana.
- Siirrä sitten näytteet toiseen WS-pisaraan (WS2) 4 minuutin ajaksi.
 - Siirrä lämmitetyt OOSYYTIT esitasapainotettuun viljelyelatusaineeseen, johon on lisäty 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennys tai 12 mg/ml toipumista varten (2–3 tuntia, jotta sukkula ehtii muodostua uudelleen), ennen seuraavia käsittelyjä.
- Lämmitykselle ALKIOILLE on kaksi vaihtoehtoa:
- Välitöntä potilaaseen siirtämistä varten: siirrä ALKIO(T) esitasapainotettuun siirtoelatusaineeseen, joka sisältää 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennyksen tai 12 mg/ml.
 - Jatkoviljelyä varten: siirrä ALKIO(T) esitasapainotettuun viljelyelatusaineeseen, joka sisältää 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennyksen tai 12 mg/ml, 4 tunnin toipumisjakson jälkeen ALKIO(T) viljelyelatusaineeseen, joka sisältää 10 % (tilavuus/tilavuus) proteiinia, ja inkuboi, kunnes on saavutettu haluttu kehitysvaihe potilaaseen siirtämistä varten.
- HUOMAUTUS: Toipuneet oosyytit on hedelmöitettävä käyttäen mikrohedelmöitystä optimaalisen tuloksen aikaansaamiseksi vitrifikaation jälkeen.

KANTAJANA OLEVAN CRYOLOCK™-LAITTEEN LÄMMITTÄMINEN:

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

- Steriili 4-kuoppainen malja tai steriilejä pieniä petrimaljoja (35 X 10 mm tai vastaava)
- Kertakäyttökäsineitä
- Siirtopipettejä
- Sekuntikello tai ajastin
- Nestetypisäiliö
- Nestetyppeä
- Elatusainetta, joka sisältää proteiinia, esitasapainotettu 37 °C:seen CO₂-lämpökaapissa ennen sulatustoimenpidettä
- 37 °C:n lämpökaappi ilman CO₂-ta tai lämmittävä alusta
- Atulat

KÄYTTÖOHJEET

Vit Kit-Thaw -ainesosat (käyttökertaa varten)

- 1 ml Thawing Solution-TS -liuosta
- 50 µl Dilution Solution-DS -liuosta
- 100 µl Washing Solution-WS -liuosta

LÄMMITYSMENETELMÄ

HUOMAUTUS: Lämmitysvaiheet sisältävät laitteen upottamisen 37 °C:n TS-liuokseen ja sen jälkeen laimentamisen ja pesemisen DS- ja WS-liuoksella huoneenlämmössä.

- Valmistele sulatusmalja (kuten Cryolock-kaaviossa, kuva 1):
 - 37 °C:ssa: Jaa aseptisesti 1 ml:n minimi-tilavuus TS-liuosta ja lämmitä 37 °C:seen lämpökaapissa, jossa ei ole CO₂-ta, tai lämmitysalustalla vähintään 30 minuutin ajan ennen lämmitystoimenpiteen aloittamista.
 - Valitse lämmitettävät Cryolock-näytteet ja siirrä ne nopeasti nestetyppisäilytyksestä nestetypellä täytettyyn pitosäiliöön valmisteluna sulatustoimenpidettä varten.
 - Aseta nestetypellä täytetty pitosäiliö työskentelyalueen ja mikroskooppialustan lähelle, jotta voit tehdä seuraavan käsittelyn säiliöstä TS-liuokseen nopeasti.
 - Poista TS-malja 37 °C:n lämpökaapistä tai lämmitysalustasta ja aseta mikroskooppialustan päälle fokuksen.
 - Pidä atulolla kiinni Cryolock-laitteen rungon yläpäästä niin, että nimitarra on ylöspäin.
- Vaihtoehto A: Poista korkki nopeasti mutta varovasti nestetypessä kääntämällä osia, kunnes ne irtoavat
- Vaihtoehto B: Ota Cryolock nopeasti pois nestetypistä ja poista sitten korkki nopeasti kääntämällä sitä varovasti.
- HUOMAUTUS: Laboratorion on katsottava viitteeksi omia laboratoriokäytäntö- ja protokollaohjeitaan. Vaihtoehtoa A ei ole hyväksytty käytettäväksi Yhdysvalloissa.

6. Upota heti Cryolock-laitteen kovera kärki niin, että näytteet ovat ylöspäin, 37 °C:n TS-liuokseen. Liikuta Cryolock-laitetta varovasti mikroskooppitarkkailussa, kunnes näytteet vapautuvat kärjestä.
7. Jätä näytteet yhteensä 1 minuutiksi TS-liuokseen.
8. Jos näytteet kelluvat, pipetoi niitä varovasti kolmekymmentä (30) sekuntia ensimmäisen upotuksen jälkeen ja aseta ne TS-liuoksen pohjalle.

Vaiheet 9–12 on tehtävä huoneenlämmössä (22–27 °C).

- Huoneenlämmössä: Jaa aseptisesti yksi (1) 50 µl:n pisara DS-liuosta steriilille petrimajalle (ks. Cryolock-kaaviota, kuva 2).
9. Siirrä näytteet DS-liuokseen 4 minuutin ajaksi. Pipetoi näytteitä varovasti kerran, jotta täydellinen huuhtelu DS-liuoksessa varmistetaan. HUOMAUTUS: Näyte pysyy kutistuneena DS-liuokselle altistumisen ajan.
 10. Kun 4 minuutin DS-liuokselle altistaminen on käynnissä, jaa aseptisesti kaksi (2) 50 µl:n pisaraa WS-liuoksia (WS1, WS2) kuten kaavakuvassa.
 11. Siirrä näytteet WS1:een, sitten WS2:een (4 minuutiksi kumpaankin), älä liikuta tai häiritse näytteitä.
 - HUOMAUTUS: Näytteiden pitäisi laajentua uudelleen alkuperäiseen kokoon 2–3 minuutin WS-liuoksessa olemisen aikana.
 12. Siirrä lämmitetyt OOSYYTIIT esitasapainotettuun viljelyelatusaineeseen, johon on lisätty 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennys tai 12 mg/ml toipumista varten (2–3 tuntia, jotta sukkula ehtii muodostua uudelleen), ennen seuraavia käsittelyjä.

Lämmittelylle ALKIOILLE on kaksi vaihtoehtoa:

- a) Välitöntä potilaaseen siirtämistä varten: siirrä ALKIO(T) esitasapainotettuun siirtoelatusaineeseen, joka sisältää 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennyksen tai 12 mg/ml.
- b) Jatkoviljelyä varten: siirrä ALKIO(T) esitasapainotettuun viljelyelatusaineeseen, joka sisältää 20 %:n (tilavuus/tilavuus) proteiinitäydennyksen tai 12 mg/ml, 4 tunnin toipumisjakson ajaksi. Siirrä toipumisjakson jälkeen ALKIO(T) viljelyelatusaineeseen, joka sisältää 10 % (tilavuus/tilavuus) proteiinia, ja inkuboi, kunnes on saavutettu haluttu kehitysvaihe potilaaseen siirtämistä varten.

Kunkin laboratorion tulee katsoa lisäohjeet näiden tuotteiden käyttöä varten omista laboratoriokäytäntö- ja protokollaohjeistaan, jotka on kehitetty ja optimoitu nimenomaan laboratorion omaa terveydenhuolto-ohjelmaa varten.

SÄILYTYSOHJEET JA STABIILIUUS

Säilytä avaamattomat pullo jääkaapissa 2–8 °C:ssa. Kun Vitrification Thaw Kit -liuoksia säilytetään ohjeiden mukaan, ne ovat stabiileja etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Kun säiliö on avattu, älä käytä elatusainetta kahdeksaa (8) viikkoa kauempaa.

Koska tuote sisältää ihmisperäistä materiaalia, siihen voi muodostua hieman hiukkasia säilytyksen aikana. Tämän tyyppisillä hiukkasilla ei tiedetä olevan mitään vaikutusta tuotteen toimintakykyyn.

VAROTOIMET JA VAROITUKSET

Tämä laite on tarkoitettu avusteisiin lisääntymistoimenpiteisiin koulutetun henkilöstön käyttöön. Näihin toimenpiteisiin kuuluu se aiottu käyttö, johon tämä laite on tarkoitettu.

Tämän laitteen käyttäjälaitoksen vastuulla on säilyttää tuotteen jäljitettävyyden, ja laitoksen on noudatettava jäljitettävyyttä koskevia asianmukaisia kansallisia säännöksiä.

Älä käytä mitään liuospulloa, jos siinä on vaurion tai vuodon merkkejä tai jos liuoksessa näkyy hiukkasia, se on samaa tai sen väri on muuttunut. Hävitä tuote sovellettavien säännösten mukaisesti.

Kontaminaatio-ongelmien välttämiseksi käsittelyssä tulee noudattaa aseptisia menetelmiä.

Tämän hetkinen tutkimuskirjallisuus osoittaa, että oosyyttien ja alkioiden vitrifikaation pitkäaikaisia vaikutuksia ei tunneta.

Älä käytä pulloa, jos sen steriili pakkaus ei ole ehjä.

EU: Ihmisen verestä tai plasmasta valmistettujen lääkinnällisten tuotteiden käytöstä johtuvien infektioiden torjunnan vakiomenetelmiä ovat luovuttajien valinta, yksittäisten luovutusten ja plasmapoolien seulonta spesifisten infektiomerkkiaineiden suhteen ja tehokkaiden valmistusvaiheiden käyttäminen virusten inaktiivointia tai poistoa varten. Tästä huolimatta ihmisen verestä tai plasmasta valmistettuja lääkevalmisteita käytettäessä ei voida kokonaan sulkea pois tartunnanaiheuttajien siirtymisen mahdollisuutta. Tämä koskee myös tuntemattomia tai kehittyviä viruksia ja muita patogeeneja. Mitään ilmoituksia todetuista virustartunnoista ei ole saatu Euroopan farmakopeamääritysten mukaisesti vakiintuneilla menetelmillä valmistettuun albumiiniin liittyen. On erittäin suositeltavaa, että aina kun Irvine Scientific, LLC -yhtiön lisääntymismenetelmiin tarkoitettuja viljelyliuoksia annetaan potilaalle, tuotteen nimi ja eränumero kirjataan, jotta yhteys potilaan ja tuote-erän välillä säilyy.

USA: Tämä tuote sisältää ihmisen seerumialbumiinia (HSA). Tämän tuotteen valmistuksessa käytetyn ihmisperäisen aineen on FDA:n lisensoimilla testipakkauksilla todettu olevan ei-reaktiivista C-hepatiitin (HCV) vasta-aineille ja ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) vasta-aineille. Mikään testausmenetelmä ei kuitenkaan tarjoa täydellistä varmuutta siitä, että ihmisperäiset tuotteet eivät aiheuta tartuntaa. Käsittele kaikkea ihmisperäistä materiaalia yleisiä varotoimenpiteitä käyttäen ikään kuin se voisi aiheuttaa infektion. Lähdeaineiden luovuttajat on seulottu myös CJD:n suhteen.

VASTA-AIHE

Tuote sisältää gentamysiinisulfaattia. On varmistettava tarkoituksenmukaisin varokeinoin, ettei potilas ole herkistynyt tälle antibiootille.

ES BRĪDINĀJUMS: tikai profesionālai lietošanai.

LIETOŠANAS INDIKĀCIJA

Vit Kit-Thaw (vitifikācijas komplekts atkausēšanai) ir paredzēts tādu vitrificētu ovocītu (MI), pronukleāru (PN) zigotu, 3. dalīšanas dienas embriju un blastocīstu stadijas embriju atkausēšanai, kas vitrificēti, izmantojot vitifikācijas komplektu sasaldēšanai (kataloga nr. 90133-SO)

IERĪCES APRAKSTS

Atļaidināšanas šķīdums (Thawing Solution-TS) ir HEPES buferšķīdums barotnei-199, kas satur gentamicīna sulfātu, 1,0 M saharozes un 20% (tilp./tilp.) dekstrāna seruma papildinājuma (DSS).

Atšķaidināšanas šķīdums (Dilution Solution-DS) ir HEPES buferšķīdums barotnei-199, kas satur gentamicīna sulfātu, 0,5 M saharozes un 20% (tilp./tilp.) DSS.

Mazgāšanas šķīdums (Washing Solution-WS) ir HEPES buferšķīdums barotnei-199, kas satur gentamicīna sulfātu un 20% (tilp./tilp.) DSS.

DSS ir proteīnu piedeva, kas sastāv no 50 mg/ml terapeitiskās kategorijas cilvēka seruma albumīna (HSA) un 20 mg/ml dekstrāna. Vit Kit-Thaw komplektā izmanto DSS 20% (tilp./tilp.), iegūstot galīgo koncentrāciju 10 mg/ml HSA un 4 mg/ml dekstrāna.

Šie trīs šķīdumi ir jālieto secīgi saskaņā ar soli pa solim veicamo mikropilienu sildīšanas protokolus.

SASTĀVS

<u>Sāļi un joni</u>	Nikotīnskābes amīds	<u>Proteīnu avots</u>	Prolīns	Cistīns
Nātrija hlorīds	Pantotēnskābe	Cilvēka seruma albumīns	Tirozīns	<u>Citas</u>
Nātrija fosfāts	Riboflavīns	<u>Buferi</u>	Alanīns	Guanīns
Kālija hlorīds	Piridoksīns	Nātrija bikarbonāts	Asparagīnskābe	Hipoksantīns
Magnija sulfāts	Tiamīns	HEPES	Glutamīnskābe	Timīns
Nātrija acetāts	Biotīns	<u>pH indikators</u>	Izoleicīns	Uracils
Kalcija hlorīds	Alfa-tokoferols	Fenolsarkanais	Leicīns	Ksantīns
Dzelzs nitrāts	Nātrija bisulfīts	<u>Makromolekulas</u>	Metionīns	Adenozīns
Holīna hlorīds	<u>Antioksidants</u>	Saharoze	Fenilalanīns	Adenīna sulfāts
<u>Vitamīni un minerālvielas</u>	Glutatīons	Dekstrāns	Serīns	Dezoksiriboze
Askorbīnskābe	<u>Antibiotikas</u>	<u>Aminoskābes</u>	Treonīns	Riboze
Aminobenzoskābe	Gentamicīna sulfāts	Arginīns	Triptofāns	<u>Ūdens</u>
Kalciferols	<u>Enerģijas avoti</u>	Glicīns	Valīns	Injekciju ūdens (WFI)
Folskābe	Glikoze	Histidīns	Cisteīns	kvalitāte
Nikotīnskābe	Inozitols	Lizīns	Hidroksiprolīns	

KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

Vit Kit-Thaw komplekta šķīdumi tiek filtrēti caur membrānu un aseptiski apstrādāti saskaņā ar apstiprinātām ražošanas procedūrām.

Ražotnē tiek veikti testi katras Vit Kit-Thaw partijas pārbaudei:

Šķīdumi

Endotoksīni – ar *Limulus* amebocīta lizāta (LAL) metodi ($\leq 0,6$ EV/ml)

Peles embrija pārbaude ($\geq 80\%$ paplašinātajā blastocīstu stadijā)

Sterilitāte ar pašreizējo USP sterilitātes testu <71> (izpildīts)

Vīsi rezultāti tiek ziņoti katrai partijai īpašā analīzes sertifikātā, kas ir pieejams pēc pieprasījuma.

CRYOTIP KĀ NESĒJA SILDĪŠANAI

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NETIEK IEKĻAUTI

- Savienotājs (kataloga nr. 40736) vai adapters
- Sterili Petri trauciņi (50 X 9 mm, Falcon 351006 vai līdzvērtīgi)
- Vienreizlietojami cimdi
- Hamilton GASTIGHT® šļirce (50 μ l), kataloga nr. 80901
- Pipetes pārnesēji (uzmaucamas stikla pipetes vai mikropipešu uzgaļi ar uzgaļa iekšējo diametru ~200 μ m)
- Pincete
- Hronometri vai taimeris
- Šķidrā slāpekļa rezervuārs (Djuāra vai putuplasta trauks ar vāku, tilpums 1–2 l)
- Šķidrā slāpekļa (pietiekami daudz 4 collu (10 cm) biezas slānim rezervuārā)
- Asas šķēres (sterīlas)
- 37 °C ūdens kolba
- Kultūras barotne ar proteīnu, kura iepriekš līdzsvarota līdz 37 °C CO₂ inkubatorā pirms atkausēšanas procedūras
- 37 °C inkubators bez CO₂ vai sildīšanas platforma

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

Vit Kit-Thaw sastāvdaļas (vienam lietojumam):

- 50 μ l atļaidināšanas šķīduma – TS
- 50 μ l atšķaidināšanas šķīduma – DS
- 100 μ l mazgāšanas šķīduma – WS
- 1 savienotājs

SILDĪŠANAS PROTOKOLS

(OVOCĪTIEM UN EMBRIJEMIEM)

- PIEZĪME: procedūras ir jāveic istabas temperatūrā (20–27 °C). Tālāk minētajām procedūrām NEIZMANTOJIET sakarsētu mikroskopa platformu.
- UZMANĪBU! Kamēr veicat darbības atļaidināšanas šķīdumos, samaziniet gaismas iedarbību uz paraugu.
- Pirms vitrificēto paraugu sildīšanas vispirms līdz istabas temperatūrai (20–27 °C) sasildiet izmantojamo TS, DS un WS daudzumu. PIEZĪME. Ja katrai reizei nepieciešama tikai daļēja TS, DS vai WS flakona, tos nedrīkst pilnībā atkārtoti sasildīt līdz istabas temperatūrai. Labāk sadalīt lietošanai paredzēto daudzumu vienādās daļās un flakonus novietot atpakaļ 2–8 °C uzreiz pēc sadalīšanas.
 - Šķidrā slāpekļa rezervuārā iepildiet šķīdros slāpekli (par ~80 % pilnu) un atlieciet blakus LN₂ saldētavai, kur atrodas atļaidināmie paraugi.
 - No glabāšanas šķidrā slāpekļī izņemiet turētājus ar kausiņiem, kuros ir CryoTips ar vitrificētajiem paraugiem, un pārlieciet tos ar šķīdros slāpekli pildītajā rezervuārā. UZMANĪBU! Nodrošiniet, ka CryoTips paliek iegremdēti LN₂ (kausīnā), kad tos no glabāšanas vietas pārvieto uz LN₂ rezervuāru, lai novērstu paraugu nekontrolētu atkušānu. Rezervuāru nolieciet blakus mikroskopam, lai varētu rīkoties ātri.
 - Sterilu Petri trauciņu (vai vāciņu) marķējiet ar nepieciešamo informāciju.
 - Pirms lietošanas saudzīgi apvēršiet TS, DS un WS flakonus, lai samaisītu saturu.
 - Trauciņā ar šķīdumu pilnīgiem sagatavojiet sildīšanas protokola izpildei:
 - aseptiskā veidā uz otrādi apgriezta sterila Petri trauciņa vāciņa izpildiniet secību pa 2 mikropilieniem, kā parādīts 1. attēlā, un trauciņu novietojiet uz mikroskopa platformas:
 - vienu 50 µl TS pilienū;
 - vienu 50 µl DS pilienū;
 - (divus WS pilienus piepildināsiēt vēlāk, 11. darbībā).
 - Blakus mikroskopam nolieciet 37 °C ūdens kolbu. Pa rokai nolieciet arī pārnesei pipeti un uzgaļus, asas sterilas šķēres, Hamilton šīrci un sterilas salvetītes.
 - Ar pinceti (vai knaibītēm) no turētāja šķidrā slāpekļī satveriet konkrēto CryoTip, kuru ātri iegremdējiet 37 °C ūdens kolbā (≥ 500 ml), un, lai CryoTip sasildītu (skatīt 2. attēlu), 3 sekundes viegli virpiniet ar iestatījumu + 24 000 °C/min.
 - CryoTip saturu ātri izdaliet tālāk paskaidrotajā veidā (skatīt 3. attēlu).
 - CryoTip ātri nosusiniet ar sterilu salvetīti.
 - Neņemiet metāla apvalka uznavu.
 - Nogrieziet plombu CryoTip platajā galā pie 4. atzīmes.
 - CryoTip plato galu drošā veidā, izmantojot savienotāju vai adapteru, piestipriniet Hamilton šīrci vai atbilstošam atsūkšanas rīkam. PIEZĪME. Pirms šīrces pievienošanas savienotājam un CryoTip par apmēram 0,5 collām (1,3 cm) izvelciet šīrces virzuli.
 - Ar sterilu salvetīti uzmanīgi nosusiniet smalko uzgali.
 - CryoTip novietojiet virs sagatavotā atļaidināšanas trauka, ātri nogrieziet plombu pie smalkā uzgala gala 2. atzīmes un CryoTip saturu maza piliena (~ 1 µl) veidā uzpildiniet sausā vietā uz trauciņa virs TS piliena (skatīt 4. attēlu).
 - PIEZĪME. SATURA IZDALES LAIKĀ NEDRĪKST VEIDOTIES BURBUĻI.
 - TS pilienus sapludiniet ar CryoTip saturu un 1 minūti atvēliet pakāpeniski sajaukties (skatīt 4. attēlu). Piezīme. Paraugi sarausias un uzpeldēs piliena augšpusē. PIEZĪME. Pēc katras parauga(-u) pārvietošanas no pārnesei pipetes izpūstiet atlikušo šķidrumu un pirms nākamās manipulācijas no nākamā piliena ievēliet mazliet šķīduma. Pārnese laikā centieties neveidot burbuļus.
 - Pārnesei pipetē ievēliet mazliet DS un paraugu(-us) no TS piliena ar minimālu tilpumu 4 minūtes pārvietojiet uz DS pilienū. PIEZĪME. DS iedarbības laikā paraugs saglabāsies sarucis. ŠAJĀ LAIKĀ IEVĒLCIET DIVUS 50 µl WS PILIENUS (WS1, WS2), KĀ PARĀDĪTS 4. ATTĒLĀ.
 - Paraugu(-us) uz 4 minūtes pārvietojiet uz WS (WS1) pilienū. PIEZĪME. Paraugam(-iem) WS ir jāpiebriest līdz sākotnējam lielumam 2–3 minūšu laikā.
 - Pēc tam paraugu(-us) uz 4 minūtes pārvietojiet uz otro WS pilienū (WS2).
 - Atļaidināto(-os) OVOCĪTU(-US) pirms nākamajām manipulācijām pārvietojiet reģenerācijai uz iepriekš līdzsvarotu barotni ar 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml (2–3 stundas, lai atjaunotos šūnu šķiedras). Ar atļaidinātajiem EMBRIJEMIEM var rīkoties divējādi:
 - atļaidinātajiem pacientiem: EMBRIJU(-US) pārlieciet iepriekš līdzsvarotā "pārnesei" barotnē, kas satur 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml;
 - tālākai kultivēšanai: EMBRIJU(-US) pārlieciet iepriekš līdzsvarotā kultūras barotnē, kas satur 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml 4 stundas ilgā reģenerācijas periodam. Pēc reģenerācijas perioda EMBRIJU(-US) pārlieciet kultūras barotnē ar 10% (tilp./tilp.) proteīnu un kultivējiet, līdz sasniegta pārnesei pacientē nepieciešamā attīstības stadija.

HSV IERĪCES KĀ NESĒJA SILDĪŠANĀ

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NAV IEKĻAUTI

- Sterils 4 iedobju trauks (Nunc 179830, 144444 vai līdzvērtīgs) vai orgānu kultūras trauks (BD Falcon 353037)
- Vienreizlietojami cimdi
- Pārnesei pipetes
- Pincete
- Hronometrs vai taimeris
- Šķidrā slāpekļa rezervuārs
- Šķidrā slāpekļa
- Šķēres, Knipex vai cita stieplu griezēja ierīce
- Kultūras barotne ar proteīnu, kura iepriekš līdzsvarota līdz 37 °C CO₂ inkubatorā pirms atkausēšanas procedūras
- 37 °C inkubators bez CO₂ vai sildīšanas platforma

Lietošanas norādījumi

Vit Kit-Thaw sastāvdaļas (vienam lietojumam):

- 250 µl atļaidināšanas šķīduma – TS
- 50 µl atšķaidīšanas šķīduma – DS
- 100 µl mazgāšanas šķīduma – WS

SILDĪŠANAS PROTOKOLS

(OVOCĪTIEM UN EMBRIJĒIEM)

- PIEZĪME: Sildīšanas darbības ietver ierīces iegremdēšanu 37 °C TS un sekojošu atšķaidīšanu un mazgāšanu DS un WS istabas temperatūrā.
- Uzstādi sildīšanas traukus (kā parādīts HSV ierīces shēmā):
 - 37 °C temperatūrā: 250 µl TS vismaz 30 minūtes pirms sildīšanas procedūras aseptiski izdaliet sterilā 4 iedobju traukā vai orgānu kultūras traukā un ievietojiet to 37 °C inkubatorā bez CO₂ vai uz sildīšanas platformas
 - PIEZĪME: Ovocītiem: izdaliet vismaz 1 ml TS
 - Nosakiet HSV salmiņu(-us), kas jāuzsilda no LN₂ glabāšanas vietas, un, sagatavojoties atlaidīšanas procedūrai, to/tos ātri pārnēsiet uz rezervuāru, kas pildīts ar LN₂.
 - LN₂ rezervuāru nolieciet blakus mikroskopam, lai tālāk varētu darboties ātri.
 - TS trauciņu izņemiet no 37 °C inkubatora vai ņemiet no sildīšanas platformas un novietojiet fokusā uz mikroskopa platformas.
 - Salmiņu paceliet tīklā, lai kļūtu redzams krāsainais darba stienītis. Galam ar paraugu(-iem) jāpaliek iegremdētam LN₂.
 - Salmiņu ar Knipex (vai citu tiepļu griezēju ierīci) nogrieziet krāsainā darba stienīša augstumā. Sarkanajai griešanas garuma vadīklai uz Knipex jābūt maksimālā garuma pozīcijā vai ņemtai.
 - Cits paņēmieni ir ar pirkstiem un īkšķi virpināt salmiņu, vienlaicīgi ar šķērēm to nogriežot 10 mm zem krāsainā darba stienīša augšdaļas.
 - Ar vienu strauju, bet kontrolētu kustību ātri satveriet darba stienīti un atdaliet to no salmiņa.
 - Noteku nekavējoties iegremdējiet 37 °C TS un uzmanīgi pavirpiniet, lai paraugs atdalītos no ierīces, un 1 minūti atstājat.
 - 12. darbība jāveic istabas temperatūrā (22–27 °C).
 - Istabas temperatūrā: 1 (vienu) 50 µl pilienu DS aseptiskā veidā uzpildiet uz sterila Petri trauciņa.
 - Pārnēsē pipetē ievieci mazliet DS un paraugu(-us) no TS piliena ar minimālu tilpumu uz 4 minūtēm pārvietojiet uz DS pilienu.
 - PIEZĪME: DS iedarbības laikā paraugs saglabāsies sarucis.
 - ŠAJĀ LAIKĀ IEVIECIET DIVUS 50 µl WS PILIENUS (WS1, WS2), KĀ PARĀDĪTS HSV IERĪCES SHĒMĀ.
 - Paraugu(-us) uz 4 minūtēm pārvietojiet uz WS (WS1) pilienu.
 - PIEZĪME: Paraugam(-iem) WS ir jāpiebriest līdz sākotnējam lielumam 2–3 minūšu laikā.
 - Pēc tam paraugu(-us) uz 4 minūtēm pārvietojiet uz otro WS pilienu (WS2).
 - Atlaidināto(-os) OVOCĪTU(-US) pirms nākamajām manipulācijām pārvietojiet reģenerācijai uz iepriekš līdzsvarotu barotni ar 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml (2–3 stundas, lai atjaunotos šūnu šķiedras).
 - Ar atlaidinātajiem EMBRIJĒIEM var rīkoties divējādi:
 - tūlītējai pārnesei pacientē: EMBRIJU(-US) pārlieciet iepriekš līdzsvarotā "pārnēses" barotnē, kas satur 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml;
 - tālākai kultivēšanai: EMBRIJU(-US) pārlieciet iepriekš līdzsvarotā kultūras barotnē, kas satur 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml 4 stundas ilgam reģenerācijas periodam. Pēc reģenerācijas perioda EMBRIJU(-US) pārlieciet kultūras barotnē ar 10% (tilp./tilp.) proteīnu un kultivējiet, līdz sasniegta pārnesei pacientē nepieciešamā attīstības stadija.
- PIEZĪME: Lai apaugļošana pēc vitrifikācijas būtu optimāla, reģenerātie ovocīti jāapauglo, izmantojot ICSI.

CRYOLOCK™ KĀ NEŠĒJA SILDĪŠANAI

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NETIEK IEKĻAUTI

- Sterils 4 šūnu trauks vai sterili nelieli Petri trauciņi (35 X 10 mm vai līdzvērtīgi)
- Vienreizlietojami cimdi
- Pārnēsē pipetes
- Hronometrs vai taimeris
- Šķidrā slāpekļa rezervuārs
- Šķidrās slāpekļi
- Kultūras barotne ar proteīnu, kura iepriekš līdzsvarota līdz 37 °C CO₂ inkubatorā pirms atkausēšanas procedūras
- 37 °C inkubators bez CO₂ vai sildīšanas platforma
- Knabiļtes

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

Vit Kit-Thaw sastāvdaļas (vienam lietojumam):

- 1 ml atlaidīšanas šķīduma – TS
- 50 µl atšķaidīšanas šķīduma – DS
- 100 µl mazgāšanas šķīduma – WS

SILDĪŠANAS PROTOKOLS

PIEZĪME: sildīšanas darbības ietver ierīces iegremdēšanu 37 °C TS un sekojošu atšķaidīšanu un mazgāšanu DS un WS istabas temperatūrā.

- Sagatavojiet atkausēšanas trauciņu (kā parādīts Cryolock shēmā, 1. attēls):
 - 37 °C temperatūrā: 1 ml kā minimālo TS tilpumu vismaz 30 minūtes pirms sildīšanas procedūras sākšanas aseptiski izdaliet un uzsidiet 37 °C inkubatorā bez CO₂ vai uz sildīšanas platformas.
 - Nosakiet sildāmo(-os) Cryolock paraugu(-us) un, sagatavojoties sildīšanas procedūrai, to/tos no LN₂ glabāšanas vietas ātri pārnēsiet uz rezervuāru, kas pildīts ar LN₂.
 - Ar LN₂ pildīto apstrādes rezervuāru novietojiet blakus darba zonai un mikroskopa platformai, lai ātri varētu veikt nākamās manipulācijas no rezervuāra uz TS.
 - TS trauciņu izņemiet no 37 °C inkubatora vai ņemiet no sildīšanas platformas un novietojiet fokusā uz mikroskopa platformas.
 - Ar knabiļtēm turiet Cryolock korpusa augšējo galu ar identifikācijas etiķeti uz augšu.
 - A iespēja: ātri, bet uzmanīgi ņemiet vāciņu zem LN₂, griežot detaļas, līdz atskrūvējas.
 - B iespēja: Cryolock izņemiet no LN₂, tad ātri ņemiet vāciņu, uzmanīgi pagriežot.
- PIEZĪME: laboratorijai ir jāizmanto savas procedūras un protokoli. A iespēja nav apstiprināta izmantošanai ASV.
- Cryolock ieliekto galu ar paraugu(-iem) uz augšu nekavējoties ielieciet 37 °C siltajā TS. Mikroskopiski novērojot, uzmanīgi virziet Cryolock, līdz paraugs(-i) izkūst no gala.
 - Paraugu(-us) kopumā 1 minūti atstājat TS.

8. Trīsdesmit (30) sekundes pēc sākotnējās iegremdēšanas uzmanīgi pipetē atšūciet paraugu(-us), ja tas (tie) peld, un palieciet TS apakšā.
- 9.–12. darbība jāveic istabas temperatūrā (22–27 °C).
 - Istabas temperatūrā: Aseptiskā veidā vienu (1) 50 µl pilieni DS uzpildiniet uz sterila Petri trauciņa (skatīt Cryolock shēmu, 2. attēls)
9. Paraugu(-s) uz 4 minūtēm pārnesiet uz DS. Paraugus saudzīgi piliniet vienu reizi, lai nodrošinātu kārtīgu skalošanu DS.
- PIEZĪME: DS iedarbības laikā paraugs saglabāsies sarucis.
10. 4 minūtes ilgās DS iedarbības laikā aseptiski piliniet divus (2) 50 µl pilienus WS (WS1, WS2), kā parādīts diagrammā.
11. Paraugu(-s) pārnesiet uz WS1, tad uz WS2 un netraucēts atstāji 4 minūtes katrā no tiem.
- PIEZĪME: paraugam(-iem) WS ir jāpiebriest līdz sākotnējam lielumam 2–3 minūšu laikā.
12. Atļaidināto(-os) OVOCĪTU(-US) pirms nākamajām manipulācijām pārvietojiet reģenerācijai uz iepriekš līdzsvarotu barotni ar 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml (2–3 stundas, lai atjaunotos šūnu šķiedras).

Ar atļaidinātajiem EMBRIJIEM var rīkoties divējādi:

- a) tūlītējai pārnesībai pacientē: EMBRIJU(-US) pārļieciet iepriekš līdzsvarotā "pārneses" barotnē, kas satur 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml;
- b) tālākai kultivēšanai: EMBRIJU(-US) pārļieciet iepriekš līdzsvarotā kultūras barotnē, kas satur 20% (tilp./tilp.) proteīnu piedevas vai 12 mg/ml 4 stundas ilgām reģenerācijas periodam. Pēc reģenerācijas perioda EMBRIJU(-US) pārļieciet kultūras barotnē ar 10% (tilp./tilp.) proteīnu un kultivē, līdz sasniegta pārnesībai pacientē nepieciešamā attīstības stadija.

Papildu informācija par šo izstrādājumu lietošanu meklējama katras laboratorijas procedūru aprakstos un protokolos, kas īpaši izstrādāti un optimizēti individuālajai medicīniskajai programmai.

GLABĀŠANAS NORĀDĪJUMI UN STABILITĀTE

Neatvērtus flakonus glabāiet ledusskapī 2–8 °C temperatūrā. Glabājot atbilstoši norādījumiem, vitrifikācijas atļaidināšanas komplektu šķīdumi ir stabili līdz derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz flakonu etiķetēm.

Barotnes pēc trauku atvēršanas drīkst izmantot ne ilgāk par astoņām (8) nedēļām.

Tā kā produkts satur cilvēka izcelsmes materiālu, glabāšanas laikā tajā var veidoties daļiņas. Nav pierādīts, ka šī veida daļiņas ietekmē produkta raksturlielumus.

PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI

Šī ierīce ir paredzēta lietošanai darbiniekiem, kas apguvuši ar palīgīdzekļiem veicamas reproduktīvās procedūras. Šīs procedūras ietver norādīto izmantošanu, kurai šī ierīce ir paredzēta.

Par izstrādājuma izsekojamības uzturēšanu atbild šīs ierīces lietotāja iestāde, kurai jāievēro valsts noteikumi par izsekojamību, ja tādi ir. Nelietojiet nevienu šķidruma flakonu, ja tas izskatās bojāts, tek, ja tajā ir redzamas daļiņas vai ja tas ir duļķains vai mainījis krāsu. Produktu likvidēt saskaņā ar spēkā esošajiem noteikumiem.

Lai izvairītos no kontaminācijas radītām problēmām, rīkojieties, izmantojot aseptiskas metodes.

Līdz šim publicētie pētījumi iegūtie rezultāti liecina, ka vitrifikācijas ilgtermiņa ietekme uz ovocītiem un embrijiem pagaidām nav zināma.

Nelietojiet nevienu pudeli, kurai ir bojāts sterlais iesaiņojums.

ES. Standarta pasākumi, lai novērstu infekcijas, ko izraisa no cilvēka asinīm vai plazmas izgatavoti medikamenti, ir donoru atlase, atsevišķu donoru materiālu un plazmas fondu skrīnings, lai noteiktu konkrētus infekcijas marķierus, un efektīvas ražošanas procesā iekļautas darbības, lai inaktivētu/atdalītu vīrusus. Neraugoties uz to, ievadot no cilvēka asinīm vai plazmas pagatavotus medikamentus, nevar pilnībā izslēgt infekciozu vielu pārmešanas iespēju. Tas attiecas arī uz nezināmiem vai jaunatklātiem vīrusiem un citiem patogēniem. Nav ziņots par pierādītiem vīrusu pārmešanas gadījumiem, lietojot albumīnu, kas izgatavots ar vispārārstiem paņēmieniem saskaņā ar Eiropas Farmakopijas specifikācijām. Lai saglabātu saikni starp pacientu un produkta sēriju, katru reizi, kad pacientei tiek ievadīti Irvine Scientific, LLC reproduktīvajām procedūrām paredzētie barotņu produkti, stingri ieteicams pierakstīt produkta nosaukumu un partijas numuru.

ASV. Šis produkts satur cilvēka seruma albumīnu (HSA). Cilvēka izcelsmes materiāls, kas izmantots šī produkta izgatavošanā, ir pārbaudīts ar FDA apstiprinātiem komplektiem, un konstatēts, ka tas nereaģē ar antivielām pret C hepatītu (HCV) un antivielām pret cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV). Tomēr neviena pārbaudes metode pilnībā negarantē, ka no cilvēka izejmateriāla iegūti produkti nav infekciozi. Ar visiem cilvēka izcelsmes materiāliem rīkojieties tā, it kā tie spētu pārnest infekciju, ievērojot vispārējus piesardzības pasākumus. Izmantojamā materiāla donori kušī pārbaudīti arī attiecībā uz KJS.

KONTRINDIKĀCIJAS

Produkts satur gentamicīna sulfātu. Lai pārļicinātos, ka pacientam nav paaugstinātas jutības pret šo antibiotiku, jāveic atbilstoši piesardzības pasākumi.

NEDERLANDS

WAARSCHUWING (EU): Alleen voor professioneel gebruik.

INDICATIE VOOR GEBRUIK

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) is bestemd voor gebruik bij het ontdoien van gevitricificeerde oöcyten (MII), pronucleaire (PN) zygoten, embryo's tot en met dag 3 van de splitsingsfase en embryo's in het blastocyststadium die gevitricificeerd zijn met behulp van de Vitrification Freeze Kit (catalogusnr. 90133-SO)

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

Thawing Solution-TS is een HEPES-gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat, 1,0 M sucrose en 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS) bevat.

Dilution Solution-DS is een HEPES-gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat, 0,5 M sucrose en 20% (v/v) DSS bevat.

Washing Solution-WS is een HEPES-gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat en 20% (v/v) DSS bevat.

DSS is een eiwit-supplement dat bestaat uit 50 mg/ml menselijk serumalbumine (HSA) van therapeutische kwaliteit en 20 mg/ml dextran. DSS wordt gebruikt bij 20% (v/v) in Vit Kit-Thaw tot een eindconcentratie van 10 mg/ml HSA en 4 mg/ml dextran.

Deze drie oplossingen moeten achtereenvolgens gebruikt worden volgens het stapsgewijze protocol voor opwarmen met microdruppels.

SAMENSTELLING

<u>Zouten en ionen</u>	Nicotinezuuramide	<u>Eiwitbron</u>	Proline	<u>Overige</u>
Natriumchloride	Pantotheenzuur	Menselijk serumalbumine	Tyrosine	Guanine
Natriumfosfaat	Riboflavine	<u>Buffers</u>	Alanine	Hypoxanthine
Kaliumchloride	Pyridoxine	Natriumbicarbonaat	Asparaginezuur	Thymine
Magnesiumsulfaat	Thiamine	HEPES	Glutaminezuur	Uracil
Natriumacetaat	Biotine	<u>pH-indicator</u>	Isoleucine	Xanthine
Calciumchloride	Alfatocoferol	Fenolrood	Leucine	Adenosine
IJzer(III)nitraat	Natriumbisulfiet	<u>Macromoleculen</u>	Methionine	Adeninesulfaat
Cholinechloride	<u>Antioxidant</u>	Sucrose	Fenylalanine	Deoxyribose
<u>Vitaminen en mineralen</u>	Glutathion	Dextran	Serine	Ribose
Ascorbinezuur	<u>Antibioticum</u>	<u>Amino-zuren</u>	Treonine	<u>Water</u>
Aminobenzoëzuur	Gentamicinesulfaat	Arginine	Tryptofaan	Farmaceutisch
Calciferol	<u>Energie-substraten</u>	Glycine	Valine	kwaliteitswater (WFI)
Foliumzuur	Glucose	Histidine	Cysteïne	
Nicotinezuur	Inositol	Lysine	Hydroxyproline	
			Cystine	

KWALITEITSBORING

De oplossingen in Vit Kit-Thaw zijn membraangefilterd en op aseptische wijze verwerkt volgens productieprocedures die zijn gevalideerd. Elke partij Vit Kit-Thaw ondergaat de volgende tests:

Oplossingen:

Endotoxine door middel van de Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-methode ($\leq 0,6$ EU/ml)

Muisembryoassay (eencellig) ($\geq 80\%$ geëxpandeerde blastocysten)

Steriliteit met de huidige Amerikaanse Pharmacopeia Sterility Test $<71>$ (voldoet)

Alle resultaten worden gerapporteerd op een partijspecifiek analysecertificaat dat op verzoek beschikbaar is.

VOOR HET OPWARMEN VAN DE CRYOTIP ALS DE DRAGER:

MATERIALEN DIE VEREIST, MAAR NIET MEEGELEVERD ZIJN

- Connector (catalogusnr. 40736) of adapter
- Steriele petrischalen (50 x 9 mm, Falcon 351006 of equivalent)
- Disposable handschoenen
- Hamilton GASTIGHT®-spuit (50 µl), catalogusnr. 80901
- Transferpipetten (getrokken glazen pipetten of micropipetpunten waarbij de punt een binnendiameter heeft van ~200 µm)
- Pincet
- Stopwatch of timer
- Vloeibare-stikstoftank (dewar of piepschuimen container met deksel, volume van 1–2 l)
- Vloeibare stikstof (volume dat voldoende is om een diepte van 4 inch (10 cm) te verkrijgen in de tank)
- Scherpe schaar (steriel)
- Waterbad van 37 °C
- Kweekmedium met eiwit, vóór de ontdooiprocedure gepre-equilibreerd tot 37 °C in een CO₂-incubator
- Incubator bij 37 °C zonder CO₂ of opwarmelement

AANWIJZINGEN VOOR GEBRUIK

Componenten van Vit Kit-Thaw (per toepassing):

- 50 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS
- 1 connector

PROTOCOL VOOR OPWARMEN

(VOOR OÖCYTEN EN EMBRYO'S):

- NB: Procedures moeten plaatsvinden bij kamertemperatuur (20–27 °C). Gebruik GEEN verwarmde microscoopafels voor de volgende procedures.
- OPGELET: Beperk tijdens het manipuleren in ontdooiplossingen de blootstelling van monsters aan licht tot het minimum.
- Breng de te gebruiken hoeveelheid TS, DS en WS op kamertemperatuur (20–27 °C) alvorens gevitricificeerde monsters op te warmen.
NB: De flacons met TS, DS en WS mogen in hun geheel niet herhaaldelijk op kamertemperatuur worden gebracht wanneer telkens slechts een kleine hoeveelheid van de oplossing nodig is. Het is beter om de te gebruiken hoeveelheid te verdelen in kleinere hoeveelheden en de flacons na het verdelen opnieuw bij 2–8 °C te plaatsen.
 - Vul de vloeibare-stikstoftank met vloeibare stikstof (~80% vol) en plaats de tank dicht bij de LN₂-vriezer waarin de te ontdooien monsters zich bevinden.
 - Verwijder de cryohouders met bekertjes met daarin de CryoTips met gevitricificeerde monsters uit de bewaring in vloeibare stikstof en breng ze over naar de met vloeibare stikstof gevulde tank.
OPGELET: Zorg dat de CryoTips ondergedompeld blijven in LN₂ (in de beker) gedurende de overbrenging van de bewaring naar de LN₂-tank om te voorkomen dat monsters ongecontroleerd ontdooien.
Plaats de tank dicht bij de microscoop om snel te kunnen handelen.
 - Label een steriele petrischaal (of deksel) met de nodige informatie.
 - Keer vóór gebruik elke flacon met TS, DS en WS tweemaal voorzichtig om, zodat de inhoud gemengd wordt.
 - Prepareer als volgt de schaal met druppels van de oplossingen voor het protocol voor opwarmen:
Pipetteer op aseptische wijze achtereenvolgens 2 microdruppels op een omgekeerde deksel van een steriele petrischaal, zoals weergegeven in afbeelding 1, en plaats de schaal op de microscoopafel:
 - één druppel TS van 50 µl
 - één druppel DS van 50 µl
 - (twee druppels WS worden later in stap 11 gereedgemaakt)
 - Plaats het waterbad van 37 °C dicht bij de microscoop. Houd het volgende bij de hand: een transferpipet en punten, een steriele scherpe schaar, een Hamilton-spuut en steriele doekjes.
 - Haal de specifieke CryoTip met behulp van een pincet (of een tangetje) uit de cryohouder in de vloeibare stikstof, dompel de CryoTip snel onder in het waterbad van 37 °C (≥ 500 ml) en draai hem voorzichtig 3 seconden lang rond om hem te laten opwarmen (zie afbeelding 2) bij +24.000 °C/min.
 - Pipetteer als volgt snel de inhoud van de CryoTip (zie afbeelding 3):
 - Veeg de CryoTip snel droog met een steriel doekje.
 - Verwijder de metalen beschermhuls.
 - Knip de afdichting door aan het brede uiteinde van de CryoTip bij markering 4.
 - Breng het brede uiteinde van de CryoTip met behulp van een connector of adapter stevig aan op de Hamilton-spuut of een geschikt aspiratiehulpmiddel.
NB: Til de pluimjer van de spuit ongeveer 0,5 inch (1,3 cm) op voordat u de spuit op de connector en de CryoTip aanbrengt.
 - Veeg de fijne punt voorzichtig droog met een steriel doekje.
 - Met de CryoTip in positie boven de geprepareerde ontdooischaal knipt u snel de afdichting door bij markering 2 van de fijne punt en pipetteert u de inhoud van de CryoTip als kleine druppel (~1 µl) op een droge plaats van de schaal boven de druppel TS (zie afbeelding 4).
NB: TIJDENS HET PIPETTEREN VAN DE INHOUD MOET BELVORMING WORDEN VOORKOMEN.
 - Meng de druppel TS met de inhoud van de CryoTip en laat ze geleidelijk mengen gedurende 1 minuut (zie afbeelding 4).
NB: De monsters zullen krimpen en naar de bovenkant van de druppel drijven.
NB: Blaas na overbrenging van het (de) monster(s) telkens eventueel achtergebleven vloeistof uit de transferpipet en zuig een kleine hoeveelheid oplossing van de volgende druppel op voordat u de volgende handeling uitvoert. Zorg dat er tijdens het overbrengen geen bellen ontstaan.
 - Zuig een kleine hoeveelheid DS op in de transferpipet en breng het (de) monster(s) gedurende 4 minuten met een minimaal volume over van de druppel TS naar de druppel DS.
NB: Het monster blijft gekrompen tijdens blootstelling aan DS.
MAAK INTUSSEN DE TWEE DRUPPELS WS (WS1, WS2) VAN 50 µl GEREED, ZOALS WEERGEGEVEN IN AFBEELDING 4.
 - Breng het (de) monster(s) gedurende 4 minuten over naar de druppel WS (WS1).
NB: Het (de) monster(s) moet(en) in WS binnen 2–3 minuten opnieuw expanderen tot de oorspronkelijke grootte.
 - Breng vervolgens het (de) monster(s) gedurende 4 minuten over naar de tweede druppel WS (WS2).
 - Breng de opgewarmde OÖCYT(EN) over naar gepre-equilibreerd kweekmedium met 20% (v/v) eiwitssupplement of 12 mg/ml voor terugwinning (2–3 uur is vereist om opnieuw een spindel te vormen) voordat daaropvolgende handelingen worden uitgevoerd.
Er zijn twee opties voor opgewarmde EMBRYO'S:
 - Voor onmiddellijke overbrenging naar de patiënt: breng het (de) EMBRYO(S) over naar het gepre-equilibreerde 'transfer'-medium dat 20% (v/v) eiwitssupplement of 12 mg/ml bevat.
 - Voor verdere kweek: breng het (de) EMBRYO(S) over naar het gepre-equilibreerde kweekmedium dat 20% (v/v) eiwitssupplement of 12 mg/ml bevat voor een terugwinperiode van 4 uur. Breng het (de) EMBRYO(S) na de terugwinperiode over naar het kweekmedium met 10% (v/v) eiwit en incubeer dienovereenkomstig totdat de gewenste ontwikkelingsfase is bereikt voor overbrenging naar de patiënt.

VOOR HET OPWARMEN VAN DE HSV STRAW ALS DE DRAGER:

MATERIALEN DIE VEREIST, MAAR NIET MEEGELEVERD ZIJN

- Steriele 4-vaks schaal (Nunc 179830, 144444 of equivalent), of orgaankweekschaal (BD Falcon 353037)
- Disposable handschoenen
- Transferpipetten
- Pincet
- Stopwatch of timer
- Vloeibare-stikstoftank
- Vloeibare stikstof
- Schaar, Knipex of andere draadsnijder

- Kweekmedium met eiwit, vóór de ontdooiprocedure gepre-equilibreerd tot 37 °C in een CO₂-incubator
- Incubator bij 37 °C zonder CO₂ of opwarmelement

AANWIJZINGEN VOOR GEBRUIK

Componenten van Vit Kit-Thaw (per toepassing)

- 250 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

PROTOCOL VOOR OPWARMEN

(VOOR OÖCYTEN EN EMBRYO'S):

NB: De opwarmstappen bestaan uit het onderdompelen van het hulpmiddel in de TS bij 37 °C en vervolgens het verdunnen en wassen in DS en WS bij kamertemperatuur.

1. Maak opwarschalen gereed (zoals weergegeven in het diagram voor de HSV Straw):
 - Bij 37 °C: Pipetteer op aseptische wijze 250 µl TS in een steriele 4-vaks schaal of een orgaankweekschaal en plaats deze in een incubator bij 37 °C zonder CO₂ of op een opwarmelement gedurende ten minste 30 minuten voorafgaand aan de opwarmprocedure.

NB: Pipetteer voor oöcyten ten minste 1 ml TS.

2. Identificeer de HSV Straw(s) die na bewaring in LN₂ moet(en) worden opgewarmd en breng deze in voorbereiding op de ontdooiprocedure snel over naar de met LN₂ gevulde tank.
3. Plaats de LN₂-tank dicht bij de microscoop om vervolgens snel te kunnen handelen.
4. Verwijder de schaal met TS uit de incubator bij 37 °C of het opwarmelement en plaats de betreffende schaal in focus op de microscoopafstel.
5. Til het rietje zover op dat de gekleurde hanteerstaf zichtbaar wordt. Zorg dat het uiteinde met het (de) monster(s) in de LN₂ ondergedompeld blijft.
6. Gebruik een Knipex (of andere draadsnijder) om het rietje ter hoogte van de gekleurde hanteerstaf door te knippen. De rode kniplengtemarkering op de Knipex moet in de maximale lengtepositie worden geplaatst of moet worden verwijderd.
 - Gebruik anders uw vingers en duim om het rietje te draaien terwijl u knipbewegingen met de schaar maakt, 10 mm onder de bovenkant van de gekleurde hanteerstaf.
7. Pak met één snelle, maar beheerste beweging snel de hanteerstaf vast en verwijder deze uit het rietje.
8. Dompel de gleuf onmiddellijk onder in de TS bij 37 °C en draai deze voorzichtig om monsters los te maken van het rietje en laat hem 1 minuut staan.

Stap 9 t/m 12 moeten bij kamertemperatuur (22–27 °C) worden uitgevoerd.

• Bij kamertemperatuur: Pipetteer op aseptische wijze één (1) druppel DS van 50 µl op een steriele petrischaal.

9. Zuig een kleine hoeveelheid DS op in de transferpipet en breng het (de) monster(s) gedurende 4 minuten met een minimaal volume over van de druppel TS naar de druppel DS.

NB: Het monster blijft gekrompen tijdens blootstelling aan DS.

MAAK INTUSSEN DE TWEE DRUPPELS WS (WS1, WS2) VAN 50 µl GEREED, ZOALS WEERGEGEVEN IN HET DIAGRAM VOOR DE HSV STRAW.

10. Breng het (de) monster(s) gedurende 4 minuten over naar de druppel WS (WS1).

NB: Het (de) monster(s) moet(en) in WS binnen 2–3 minuten opnieuw expanderen tot de oorspronkelijke grootte.
11. Breng vervolgens het (de) monster(s) gedurende 4 minuten over naar de tweede druppel WS (WS2).
12. Breng de opgewarmde OÖCYT(EN) over naar gepre-equilibreerd kweekmedium met 20% (v/v) eiwitsupplement of 12 mg/ml voor terugwinning (2–3 uur is vereist om opnieuw een spindel te vormen) voordat daaropvolgende handelingen worden uitgevoerd.

Er zijn twee opties voor opgewarmde EMBRYO'S:

- a) Voor onmiddellijke overbrenging naar de patiënt: breng het (de) EMBRYO('S) over naar het gepre-equilibreerde 'transfer'-medium dat 20% (v/v) eiwitsupplement of 12 mg/ml bevat.
- b) Voor verdere kweek: breng het (de) EMBRYO('S) over naar het gepre-equilibreerde kweekmedium dat 20% (v/v) eiwitsupplement of 12 mg/ml bevat voor een terugwinperiode van 4 uur. Breng het (de) EMBRYO('S) na de terugwinperiode over naar het kweekmedium met 10% (v/v) eiwit en incubeer dienovereenkomstig totdat de gewenste ontwikkelingsfase is bereikt voor overbrenging naar de patiënt.

NB: Teruggewonnen oöcyten moeten door middel van ICSI worden bevrucht voor optimale bevruchting na vitrificatie.

VOOR HET OPWARMEN VAN DE CRYOLOCK™ ALS DE DRAGER:

MATERIALEN DIE VEREIST, MAAR NIET MEEGELEVERD ZIJN

- Steriele 4-vaks petrischaal of steriele, kleine petrischalen (35 x 10 mm of equivalent)
- Disposable handschoenen
- Transferpipetten
- Stopwatch of timer
- Vloeibare-stikstoftank
- Vloeibare stikstof
- Kweekmedium met eiwit, vóór de ontdooiprocedure gepre-equilibreerd tot 37 °C in een CO₂-incubator
- Incubator bij 37 °C zonder CO₂ of opwarmelement
- Forceps

AANWIJZINGEN VOOR GEBRUIK

Componenten van Vit Kit-Thaw (per toepassing)

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

PROTOCOL VOOR OPWARMEN

NB: De opwarmstappen bestaan uit het onderdompelen van het hulpmiddel in de TS bij 37 °C en vervolgens het verdunnen en wassen in DS en WS bij kamertemperatuur.

1. Maak de ontdooischaal gereed (zoals weergegeven in het Cryolock-diagram, afbeelding 1):
 - Bij 37 °C: Pipetteer op aseptische wijze een volume van ten minste 1 ml TS en warm op tot 37 °C in een incubator zonder CO₂ of op een opwarmelement gedurende ten minste 30 minuten voordat u start met de opwarmprocedure.

2. Identificeer het (de) op te warmen Cryolock-monster(s) en breng het (ze) snel over van bewaring in LN₂ naar een met LN₂ gevulde tank als voorbereiding op de opwarmprocedure.
3. Plaats de met LN₂ gevulde tank dicht bij het werkpoppervlak en de tafel van de microscoop, zodat de daaropvolgende handeling van de tank naar TS snel kan plaatsvinden.
4. Verwijder de schaal met TS uit de incubator bij 37 °C of het opwarmelement en plaats de betreffende schaal in focus op de microscopetafel.
5. Houd met behulp van de forceps het bovenste uiteinde van de Cryolock-behuizing vast met het identificatielabel omhoog gericht.

Optie A: Verwijder snel maar voorzichtig de dop onder de LN₂ en draai de delen totdat ze vrijkomen.

Optie B: Neem de Cryolock snel uit de LN₂ en verwijder de dop vervolgens snel met een voorzichtige draai beweging.

NB: Het laboratorium moet zijn eigen procedures en protocollen raadplegen. Optie A is niet goedgekeurd voor gebruik in de Verenigde Staten.

6. Dompel de concave punt van de Cryolock, met het (de) monster(s) omhoog gericht, onmiddellijk in de TS bij 37 °C. Beweeg de Cryolock voorzichtig, terwijl u dit onder de microscoop observeert, totdat het (de) monster(s) vrijkomen van de punt.
7. Laat (het) de monster(s) in totaal 1 minuut in de TS.
8. Dertig (30) seconden na de aanvankelijke onderdompeling pipetteert u voorzichtig het (de) monster(s) als het (ze) zweeft (zweven), en plaatst u het (ze) op de bodem van de TS.

Stap 9 t/m 12 moeten bij kamertemperatuur (22–27 °C) worden uitgevoerd.

- Bij kamertemperatuur: Pipetteer op aseptische wijze één (1) druppel DS van 50 µl op een steriele petrischaal (zie Cryolock-diagram, afbeelding 2).

9. Breng het (de) monster(s) over naar DS gedurende 4 minuten. Pipetteer de monsters voorzichtig eenmaal om te verzekeren dat ze volledig gespoeld zijn in DS.

NB: Het monster blijft gekrompen tijdens blootstelling aan DS.

10. Tijdens blootstelling in DS gedurende 4 minuten pipetteert u (2) druppels WS (WS1, WS2) van 50 µl op aseptische wijze, zoals weergegeven in het diagram.

11. Pipetteer het (de) monster(s) naar WS1, daarna WS2 gedurende telkens 4 minuten, ongestoord.

NB: Het (de) monster(s) moet(en) in WS binnen 2–3 minuten opnieuw expanderen tot de oorspronkelijke grootte.

12. Breng de opgewarmde OÖCYT(EN) over naar gepre-equilibreerd kweekmedium met 20% (v/v) eiwit-supplement of 12 mg/ml voor terugwinning (2–3 uur is vereist om opnieuw een spindel te vormen) voordat daaropvolgende handelingen worden uitgevoerd.

Er zijn twee opties voor opgewarmde EMBRYO'S:

- a) Voor onmiddellijke overbrenging naar de patiënt: breng het (de) EMBRYO(S) over naar het gepre-equilibreerde 'transfer'-medium dat 20% (v/v) eiwit-supplement of 12 mg/ml bevat.
- b) Voor verdere kweek: breng het (de) EMBRYO(S) over naar het gepre-equilibreerde kweekmedium dat 20% (v/v) eiwit-supplement of 12 mg/ml bevat voor een terugwinperiode van 4 uur. Breng het (de) EMBRYO(S) na de terugwinperiode over naar het kweekmedium met 10% (v/v) eiwit en incubeer dienovereenkomstig totdat de gewenste ontwikkelingsfase is bereikt voor overbrenging naar de patiënt.

Voor aanvullende informatie over het gebruik van deze producten dienen alle laboratoria hun eigen laboratoriumprocedures en -protocollen te raadplegen die speciaal zijn ontwikkeld en geoptimaliseerd voor uw individueel medisch programma.

INSTRUCTIES VOOR BEWARING; STABILITEIT

Bewaar de ongeopende flacons gekoeld bij 2 °C tot 8 °C. Wanneer Vitricification Thaw Kit-oplossingen worden bewaard volgens de instructies, zijn ze stabiel tot aan de houdbaarheidsdatum die op het etiket van de flacons is vermeld.

Gebruik media niet langer dan acht (8) weken nadat de containers geopend zijn.

Aangezien het product menselijk bronmateriaal bevat, kunnen er zich tijdens bewaring (vaste) deeltjes vormen. Deze (vaste) deeltjes hebben voor zover bekend geen invloed op de prestaties van het product.

VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Dit hulpmiddel is bedoeld voor gebruik door medewerkers die opgeleid zijn in geassisteerde voortplantingsprocedures. Tot deze procedures behoort het gebruik waarvoor dit hulpmiddel bedoeld is.

De instelling waarin dit hulpmiddel wordt gebruikt, is verantwoordelijk voor het behoud van de traceerbaarheid van het product en moet, waar van toepassing, voldoen aan de nationale voorschriften met betrekking tot traceerbaarheid.

Gebruik geen flacon met een oplossing die beschadigd is, lekt, (vaste) deeltjes bevat of troebel is, of van kleur veranderd is. Voer het product af volgens de geldende voorschriften.

Gebruik aseptische methoden om besmettingsproblemen te vermijden.

Momenteel wijst onderzoeksliteratuur uit dat de lange-termijneffecten van vitrificatie op oöcyten en embryo's onbekend blijven.

Gebruik geen flessen waarvan de steriele verpakking beschadigd is.

EU: Tot de standaardmaatregelen ter voorkoming van infecties door gebruik van geneesmiddelen die bereid zijn uit menselijk bloed of plasma behoren de selectie van donors, de screening van individuele donaties en plasmapoelen op specifieke infectiemarkers en de toepassing van effectieve productiestappen voor de inactivatie/verwijdering van virussen. Desondanks kan bij toediening van geneesmiddelen die zijn bereid uit menselijk bloed of plasma, de mogelijke overdracht van infectieuze organismen niet geheel worden uitgesloten. Dit geldt ook voor onbekende of toekomstige virussen en andere pathogenen. Er zijn geen meldingen ontvangen van bewezen virusoverdrachten bij albumine dat met behulp van gevestigde processen volgens de specificaties van Europese Farmacopée is gefabriceerd. U wordt dringend aangeraden om telkens wanneer een patiënt kweekmedia voor voortplantingsprocedures van Irvine Scientific, LLC krijgt toegediend, de naam en het partijnummer van het product te noteren, zodat er een link blijft bestaan tussen de patiënt en de productpartij.

VS: Dit product bevat menselijk serumalbumine (HSA). Het menselijke bronmateriaal dat wordt gebruikt bij de vervaardiging van dit product is getest met door de Amerikaanse Inspectiedienst voor Voedings- en Geneesmiddelen (FDA) goedgekeurde kits. Daaruit is gebleken dat het niet reageert op de antistoffen voor hepatitis C (HCV) en antistoffen voor het menselijk immuundeficiëntievirus (HIV). Geen enkele testmethode biedt echter volledige zekerheid dat producten afkomstig van menselijke bronnen niet besmettelijk zijn. Ga met al het menselijk bronmateriaal om alsof het infecties kan overdragen en neem universele voorzorgsmaatregelen. Donors van het bronmateriaal zijn ook gecontroleerd op de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (CJD).

CONTRA-INDICATIE

Het product bevat gentamicinesulfaat. Passende voorzorgsmaatregelen dienen te worden genomen om te verzekeren dat de patiënt niet gevoelig is voor dit antibioticum.

UE — UWAGA: Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych.

PRZEZNACZENIE

Zestaw Vit Kit-Thaw (Vitification Thaw Kit) jest przeznaczony do rozmrażania ludzkich oocytów (MI), zygot, w których obecne są przedjądrza (PN), do 3. dnia brudzkowania w rozwoju zarodkowym oraz zarodków w stadium blastocysty poddanych wityfikacji przy użyciu zestawu Vitification Freeze Kit (nr katalogowy 90133-SO).

OPIS WYROBU

Roztwór **Thawing Solution-TS** to roztwór pożywki Medium-199 zbuforowany HEPES, zawierający siarczan gentaminy, roztwór sacharozy w stężeniu 1,0 M i 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek Dextran Serum Supplement (DSS).

Roztwór **Dilution Solution-DS** to roztwór pożywki Medium-199 zbuforowany HEPES, zawierający siarczan gentaminy, roztwór sacharozy w stężeniu 0,5 M i 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek DSS.

Roztwór **Washing Solution-WS** to roztwór pożywki Medium-199 zbuforowany HEPES, zawierający siarczan gentaminy i 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek DSS.

DSS to dodatek białkowy, w którego skład wchodzi 50 mg/ml albuminy surowicy ludzkiej (HSA) o przeznaczeniu terapeutycznym i 20 mg/ml dekstranu. DSS jest używany w zestawie Vit Kit-Thaw w stężeniu 20-procentowym (stęż. obj.), co daje końcowe łączne stężenie HSA równe 10 mg/ml i dekstranu równe 4 mg/ml.

Tych trzech roztworów należy używać w odpowiedniej kolejności zgodnie z protokołem ogrzewania, który obejmuje sekwencyjne przeniesienie oocytów/zarodków do mikropropelek.

SKŁAD

<u>Sole i jony</u>	Amid kwasu nikotynowego	<u>Źródło białka</u>	Lizyna	Hydroksypolina
Chlorek sodu	Kwas pantotenowy	Albumina surowicy ludzkiej	Prolina	Cystyna
Fosforan sodu	Ryboflawina	<u>Bufory</u>	Tyrozyna	<u>Inne</u>
Chlorek potasu	Pirydoksyna	Wodorowęglan sodu	Alanina	Guanina
Siarczan magnezu	Tiamina	HEPES	Kwas asparaginowy	Hipoksantyna
Octan sodu	Biotyna	<u>Wskaźnik pH</u>	Kwas glutaminowy	Tymina
Chlorek wapnia	Alfa-tokoferol	Czerwień fenolowa	Izoleucyna	Uracyl
Azotan żelaza(III)	Wodorosiarczyny sodu	<u>Makrocząsteczki</u>	Leucyna	Ksantyna
Chlorek cholina	<u>Antyoksydant</u>	Sacharoza	Metionina	Adenozyna
<u>Witaminy i minerały</u>	Glutation	Dekstran	Feniloalanina	Siarczan adeniny
Kwas askorbinowy	<u>Antybiotyk</u>	<u>Aminokwasy</u>	Seryna	Deoksyryboza
Kwas aminobenzoesowy	Siarczan gentaminy	Arginina	Treonina	Ryboza
Kalcyferol	<u>Substraty energetyczne</u>	Glicyna	Tryptofan	<u>Woda</u>
Kwas foliowy	Glukoza	Histydyna	Walina	Woda o jakości WFI
Kwas nikotynowy	Inozytol		Cysteina	

ZAPEWNIENIE JAKOŚCI

Roztwory dostarczone w zestawie Vit Kit-Thaw są filtrowane membranowo i przetwarzane aseptycznie zgodnie ze zweryfikowanymi procedurami wytwarzania.

Każda seria zestawu Vit Kit-Thaw jest poddawana następującym testom:

Roztwory:

Badanie pod kątem obecności endotoksyn metodą Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Badanie na zarodku mysim (jednokomórkowym) (rozwoj $\geq 80\%$ spośród jednokomórkowych zarodków w stadium blastocysty)

Badanie sterylności, zgodnie z najnowszym badaniem sterylności wg Farmakopei Amerykańskiej (USP) $<71>$ (wymagania spełnione)

Wszystkie wyniki są notowane na swoistym dla danej serii Świadectwie analizy, które jest dostępne na żądanie.

DO STOSOWANIA W CELU OGRZANIA PRODUKTU CRYOTIP UŻYWANEGO JAKO NOŚNIK:

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Złącze (nr katalogowy 40736) lub adapter
- Sterylne szalki Petriego (50 X 9 mm, Falcon 351006 lub odpowiednik)
- Jednorazowe rękawiczki
- Strykawka Hamilton GASTIGHT® (50 μ l), nr katalogowy 80901
- Pipety transferowe (pipety szklane lub końcówki do mikropipet o wewnętrznej średnicy końcówki ~ 200 μ m)
- Peśeta
- Stoper lub minutnik
- Zbiornik na ciekły azot (dewar lub pojemnik styropianowy z wieczkiem, objętość 1–2 l)
- Ciekły azot (objętość wystarczająca do napełnienia zbiornika do głębokości 4 cali (10 cm))
- Ostre nożyczki (sterylne)
- Łażnia wodna nastawiona na temperaturę 37°C
- Pożywka hodowlana z dodatkiem białka, wstępnie zrównoważona do temperatury 37°C w inkubatorze z atmosferą CO₂ przed procedurą rozmrażania
- Inkubator z możliwością nastawy temperatury 37°C bez atmosfery CO₂ lub podgrzewany stolik

INSTRUKCJA UŻYCIA

Składniki zestawu Vit Kit-Thaw (na jedno zastosowanie):

- 50 μ l roztworu Thawing Solution-TS
- 50 μ l roztworu Dilution Solution-DS
- 100 μ l roztworu Washing Solution-WS
- 1 złącze

PROTOKÓŁ OGRZEWANIA

(DLA OCYOTÓW I ZARODKÓW):

UWAGA: Procedury należy wykonywać w temperaturze pokojowej (20–27°C). Podczas wykonywania poniższych procedur NIE NALEŻY korzystać z podgrzewanego stolika mikroskopowego.

PRZESTROGA: Podczas manipulacji ocyotami/zarodkami w roztworach do rozmrażania należy zminimalizować ich ekspozycję na światło.

1. Przed rozpoczęciem ogrzewania ocyotów/zarodków poddanych witrifikacji doprowadzić odpowiednie objętości roztworów TS, DS i WS do temperatury pokojowej (20–27°C).

UWAGA: Należy unikać wielokrotnego doprowadzania całej zawartości fiolek z roztworami TS, DS i WS do temperatury pokojowej, gdy za każdym razem potrzebna jest tylko mała ilość każdego roztworu. Lepszym rozwiązaniem jest wydzielenie z ich zawartości porcji, która ma zostać użyta, a następnie umieszczenie fiolek z powrotem w temperaturze 2–8°C.

2. Napchnąć zbiornik ciekłym azotem (do ok. 80% pojemności zbiornika) i umieścić go w pobliżu zamrażarki z LN₂, w której przechowywane są ocyoty/zarodki.
3. Wyjąć prety z kubkami zawierającymi produkty CryoTip z ocyotami/zarodkami poddanymi witrifikacji z zamrażarki z ciekłym azotem i przenieść je do zbiornika napełnionego ciekłym azotem.

PRZESTROGA: Aby uniknąć niekontrolowanego rozmrożenia ocyotów/zarodków, podczas przenoszenia produktów CryoTip z zamrażarki do zbiornika z LN₂ produkty te muszą być zanurzone w LN₂ (w kubeczku).

Umieścić zbiornik w pobliżu mikroskopu, aby umożliwić szybkie wykonywanie kolejnych kroków.

4. Oznaczyć odpowiednimi danymi sterylną szalkę Petriego (lub wieczko).
5. Przed użyciem delikatnie odwrócić każdą fiolkę roztworu TS, DS i WS dwa razy, aby wymieszać zawartość fiolek.
6. Przygotować szalkę z kropelkami roztworów do protokołu ogrzewania zgodnie z poniższym opisem:

W sposób aseptyczny nanieść 2 mikrokropelki na odwrócone wieczko sterylnej szalki Petriego, zgodnie z Ryc. 1, a następnie umieścić szalkę na stoliku mikroskopowym:

- jedna kropelka roztworu TS o objętości 50 µl
- jedna kropelka roztworu DS o objętości 50 µl
- (dwie kropelki roztworu WS zostaną naniesione później, w kroku 11)

7. Umieścić łaźnię wodną nastawioną na temperaturę 37°C w pobliżu mikroskopu. Przygotować następujący sprzęt i umieścić go w pobliżu: pipetę transferową i końcówki do pipet, sterylne, ostre nożyczki, strzykawkę Hamilton i sterylne ręczniki.

8. Przy użyciu pęsety (lub szczypiec) wyciągnąć żądany produkt CryoTip z preta zanurzonego w ciekłym azocie, szybko zanurzyć produkt CryoTip w łaźni wodnej nastawionej na temperaturę 37°C (≥500 ml) i delikatnie poruszać produktem przez 3 sekundy w celu jego ogrzania (patrz Ryc. 2) z szybkością +24 000°C/min.

9. Szybko przenieść zawartość produktu CryoTip zgodnie z poniższym opisem (patrz Ryc. 3):

- Szybko wytrzeć produkt CryoTip do sucha przy użyciu sterylnego ręcznika.
- Zdjąć metalową osłonkę.
- Przeciąć zgrzew na szerokim końcu produktu CryoTip na poziomie znacznika nr 4.
- Dobrze podłączyć szeroki koniec produktu CryoTip do strzykawki Hamilton lub odpowiedniego wyrobu do aspiracji, używając złącza lub adaptera.

UWAGA: Przed podłączeniem strzykawki do złącza i produktu CryoTip należy unieść tłok strzykawki o około 0,5 cala (1,3 cm).

UWAGA: Delikatnie wytrzeć cienką końcówkę do sucha przy użyciu sterylnego ręcznika.

- Trzymając produkt CryoTip nad przygotowaną szalką do rozmrażania, szybko przeciąć zgrzew na poziomie znacznika 2 na cienkiej końcówce i wypuścić zawartość produktu CryoTip w postaci małej kropli (~1 µl) na suchy obszar na szalce nad kropelką roztworu TS (patrz Ryc. 4).

UWAGA: PODCZAS WYPUSZCZANIA ZAWARTOŚCI NALEŻY ZAPOBIEGAĆ WYTWARZANIU PĘCHERZYKÓW POWIETRZA.

10. Połączyć kropelkę roztworu TS z zawartością wypuszczoną z produktu CryoTip i pozostawić na 1 minutę, aby umożliwić stopniowe wymieszanie się obu roztworów (patrz Ryc. 4).

Uwaga: Ocyoty/zarodek skurczy się i wypłynie na wierzch kropelki.

UWAGA: Po każdym kroku przeniesienia ocyotów/zarodków przed kolejną manipulacją należy wypuścić pozostały płyn z pipety transferowej i pobrać małą objętość roztworu z kolejnej kropelki. Unikać wytwarzania pęcherzyków powietrza podczas przenoszenia ocyotów/zarodków.

11. Pobrać małą objętość roztworu DS do pipety transferowej, a następnie przenieść ocyoty/zarodki w minimalnej objętości roztworu z kropelki roztworu TS do kropelki roztworu DS i pozostawić na 4 minuty.

UWAGA: Podczas ekspozycji na roztwór DS ocyoty/zarodek pozostanie skurczony.

W TYM CZASIE NALEŻY PRZYGOTOWAĆ DWIE KROPELKI ROZTWORU WS (WS1, WS2) O OBJĘTOŚCI 50 µl KAŻDA, ZGODNIE Z RYC. 4.

12. Przenieść ocyoty/zarodki do kropelki roztworu WS (WS1) i pozostawić na 4 minuty.

UWAGA: Podczas inkubacji w roztworze WS ocyoty/zarodki powinny powiększyć się do pierwotnego rozmiaru w ciągu 2–3 minut.

13. Następnie przenieść ocyoty/zarodki do drugiej kropelki roztworu WS (WS2) i pozostawić na 4 minuty.

14. Przed rozpoczęciem dalszych procedur ogrzane OCYOTY należy przenieść do wstępnie zrównoważonej pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 20% (stęż. obj.) lub 12 mg/ml w celu ich zregenerowania (inkubować 2–3 godziny, aby umożliwić ponowne utworzenie wrzeciona).

Z ogrzanyimi ZARODKAMI można postępować na dwa sposoby:

a) W celu bezwzględnego przeniesienia zarodka do ciała pacjentki: przenieść ZARODKI do wstępnie zrównoważonej pożywki „transportowej” z dodatkiem białka w stężeniu 20% (stęż. obj.) lub 12 mg/ml.

b) W celu prowadzenia dalszej hodowli: przenieść ZARODKI do wstępnie zrównoważonej pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 20% (stęż. obj.) lub 12 mg/ml i inkubować przez 4 godziny w celu ich zregenerowania. Po okresie regeneracji przenieść ZARODKI do pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 10% (stęż. obj.) i inkubować do momentu osiągnięciażądanego stadium rozwojowego w celu przeniesienia zarodka do ciała pacjentki.

DO STOSOWANIA W CELU OGRZANIA SŁOMKI HSV UŻYWANEJ JAKO NOŚNIK:

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Sterylna 4-dółkowa płytka (Nunc 179830, 144444 lub odpowiednik) lub naczynie hodowlane Organ Culture Dish (BD Falcon 353037)
- Jednorazowe rękawiczki
- Pipety transferowe
- Peseta
- Stoper lub minutnik
- Zbiornik na ciekły azot
- Ciekły azot
- Nożyczki, nożyce Knipex lub inny wyrób do przecinania drutu

- Pożywka hodowlana z dodatkiem białka, wstępnie zrównoważona do temperatury 37°C w inkubatorze z atmosferą CO₂ przed procedurą rozmrażania
- Inkubator z możliwością nastawy temperatury 37°C bez atmosfery CO₂ lub podgrzewany stolik

INSTRUKCJA UŻYCIA

Składniki zestawu Vit Kit-Thaw (na jedno zastosowanie)

- 250 µl roztworu Thawing Solution-TS
- 50 µl roztworu Dilution Solution-DS
- 100 µl roztworu Washing Solution-WS

PROTOKÓŁ OGRZEWANIA

(DLA OOCYTÓW I ZARODKÓW):

UWAGA: Kroki ogrzewania obejmują zanurzenie wyrobu w roztworze TS ogrzanym do temperatury 37°C, a następnie rozcieńczanie i przepłukiwanie w roztworach DS i WS o temperaturze pokojowej.

1. Przygotować naczynia do ogrzewania (zgodnie ze schematem dla słomki HSV Straw):
 - W temperaturze 37°C: Przed rozpoczęciem procedury ogrzewania należy w sposób aseptyczny nanieść 250 µl roztworu TS na sterylną 4-dółkową płytkę lub naczynie hodowlane Organ Culture Dish i ogrzać go do temperatury 37°C w inkubatorze bez atmosfery CO₂ lub na ogrzewanym stoliku przez co najmniej 30 minut.
- UWAGA: W przypadku oocytów należy nanieść co najmniej 1 ml roztworu TS.
2. Zidentyfikować słomki HSV Straw, które mają zostać ogrzane, w zamrażarce z LN₂, i szybko przenieść je do zbiornika napelnionego LN₂, w celu przygotowania do procedury rozmrażania.
3. Umieścić zbiornik z LN₂ w pobliżu mikroskopu, aby umożliwić szybkie wykonywanie kolejnych kroków.
4. Wyjąć naczynie z roztworem TS z inkubatora nastawionego na temperaturę 37°C lub zdjąć z podgrzewanego stolika i umieścić je na stoliku mikroskopowym; wyregulować ostrość mikroskopu.
5. Unieść słomkę tak, aby odsłonić kolorowy precik manipulacyjny. Końcówka z oocytem/zarodkiem musi pozostawać zanurzona w LN₂.
6. Używając nożyc Knipex (lub innego wyrobu do przecinania drutu) odciąć słonek na wysokości kolorowego precika manipulacyjnego. Czerwona prowadnica do cięcia wzdłużnego na nożycach Knipex powinna być ustawiona w pozycji maksymalnej długości lub całkowicie zdjęta.
 - Można też używać palców i kciuka do obracania słomki podczas wykonywania cięcia nożycami, 10 mm pod górną częścią kolorowego precika manipulacyjnego.
7. Jednym szybkim, ale kontrolowanym ruchem, szybko chwycić precik manipulacyjny i wyciągnąć go ze słomki.
8. Bezwzględnie zanurzyć rowek w roztworze TS o temperaturze 37°C i delikatnie zamieszać nim w roztworze, aby odłączyć od niego oocyty/zarodki. Pozostawić na 1 minutę.

Kroki 9–12 należy wykonywać w temperaturze pokojowej (22–27°C).

• W temperaturze pokojowej: W sposób aseptyczny nanieść jedną (1) kropelkę roztworu DS o objętości 50 µl na sterylną szalikę Petriego.

9. Pobrać małą objętość roztworu DS do pipety transferowej, a następnie przenieść oocyty/zarodki w minimalnej objętości roztworu z kropelki roztworu TS do kropelki roztworu DS i pozostawić na 4 minuty.

UWAGA: Podczas ekspozycji na roztwór DS oocyty/zarodki będzie skurczony.

PODCZAS TEJ INKUBACJI NALEŻY PRZYGOTOWAĆ DWIE KROPELKI ROZTWORU WS (WS1, WS2) O OBJĘTOŚCI 50 µl KAŻDA, ZGODNIE ZE SCHEMATEM DLA SŁOMKI HSV.

10. Przenieść oocyty/zarodki do kropelki roztworu WS (WS1) i pozostawić na 4 minuty.
 - UWAGA: Podczas inkubacji w roztworze WS oocyty/zarodki powinny powiększyć się do pierwotnego rozmiaru w ciągu 2–3 minut.
11. Następnie przenieść oocyty/zarodki do drugiej kropelki roztworu WS (WS2) i pozostawić na 4 minuty.
12. Przed rozpoczęciem dalszych procedur ogrzane OOCYTY należy przenieść do wstępnie zrównoważonej pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 20% (steż. obj.) lub 12 mg/ml w celu ich zregenerowania (inkubować 2–3 godziny, aby umożliwić ponowne utworzenie wrzeciona).

Z ogrzanyh ZARODKAMI można postępować na dwa sposoby:

- a) W celu bezwzględnego przeniesienia zarodka do ciała pacjentki: przenieść ZARODKI do wstępnie zrównoważonej pożywki „transportowej” z dodatkiem białka w stężeniu 20% (steż. obj.) lub 12 mg/ml.
- b) W celu prowadzenia dalszej hodowli: przenieść ZARODKI do wstępnie zrównoważonej pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 20% (steż. obj.) lub 12 mg/ml i inkubować przez 4 godziny w celu ich zregenerowania. Po okresie regeneracji przenieść ZARODKI do pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 10% (steż. obj.) i inkubować do momentu osiągnięciażądanego stadium rozwojowego w celu przeniesienia zarodka do ciała pacjentki.

UWAGA: Zregenerowane oocyty należy zapłodnić zgodnie z protokołem ICSI zapewniającym optymalne zapłodnienie po wityfikacji.

DO STOSOWANIA W CELU OGRZANIA PRODUKTU CRYOLOCK™ UŻYWANEGO JAKO NOŚNIK:

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Sterylna 4-dółkowa płytką lub sterylna szalka Petriego o małym rozmiarze (35 X 10 mm lub odpowiednik)
- Jednorazowe rękawiczki
- Pipety transferowe
- Stoper lub minutnik
- Zbiornik na ciekły azot
- Ciekły azot
- Pożywka hodowlana z dodatkiem białka, wstępnie zrównoważona do temperatury 37°C w inkubatorze z atmosferą CO₂ przed procedurą rozmrażania
- Inkubator z możliwością nastawy temperatury 37°C bez atmosfery CO₂ lub podgrzewany stolik
- Szczypce

INSTRUKCJA UŻYCIA

Składniki zestawu Vit Kit-Thaw (na jedno zastosowanie)

- 1 ml roztworu Thawing Solution-TS
- 50 µl roztworu Dilution Solution-DS
- 100 µl roztworu Washing Solution-WS

PROTOKÓŁ OGRZEWANIA

UWAGA: Kroki ogrzewania obejmują zanurzenie wyrobu w roztworze TS ogrzanym do temperatury 37°C, a następnie rozcieńczanie i przepłukiwanie w roztworach DS i WS o temperaturze pokojowej.

1. Przygotować naczynie, na którym będzie wykonywane rozmrażanie (w sposób przedstawiony na schemacie dla produktu Cryolock, Ryc. 1):
 - W temperaturze 37°C: Przed rozpoczęciem procedury ogrzewania należy w sposób aseptyczny nanieść co najmniej 1 ml roztworu TS i ogrzać go do temperatury 37°C w inkubatorze bez atmosfery CO₂ lub na ogrzewanym stoliku przez co najmniej 30 minut.
2. Zidentyfikować oocyty/zarodki znajdujące się w produkcie Cryolock, które mają zostać ogrzane, i szybko przenieść je z zamrażarki z LN₂ do zbiornika napełnionego LN₂ w celu przygotowania do procedury ogrzewania.
3. Umieścić zbiornik napełniony LN₂ w pobliżu obszaru roboczego i stolika mikroskopowego, aby umożliwić szybkie przenoszenie oocytów/zarodków ze zbiornika do roztworu TS w późniejszym czasie.
4. Wyjąć naczynie z roztworem TS z inkubatora nastawionego na temperaturę 37°C lub zdjąć z podgrzewanego stolika i umieścić je na stoliku mikroskopowym; wyregulować ostrość mikroskopu.
5. Trzymać górny koniec korpusu produktu Cryolock szczypcami w taki sposób, aby etykieta identyfikacyjna była skierowana w górę.
 - Opcja A: Szybko, ale delikatnie zdjąć zatyczkę zanurzoną w LN₂, przekierując ją do momentu jej zwolnienia.
 - Opcja B: Szybko wyjąć produkt Cryolock z LN₂, a następnie szybko zdjąć zatyczkę, delikatnie ją przekierując.

UWAGA: Laboratoria powinny odnieść się do własnych procedur i protokołów. Opcja A nie została dopuszczona do stosowania w Stanach Zjednoczonych.

6. Bezwzględnie zanurzyć wkłęsły koniec produktu Cryolock w roztworze TS o temperaturze 37°C w taki sposób, aby oocyty/zarodki były skierowane w górę. Prowadząc obserwację pod mikroskopem, ostrożnie poruszać produktem Cryolock do momentu odcepienia oocytów/zarodków od końcówki.
 7. Pozostawić oocyty/zarodki na 1 minutę w roztworze TS.
 8. Jeśli po trzydziestu (30) sekundach od wstępnego zanurzenia oocyty/zarodki unoszą się na powierzchni roztworu TS, delikatnie przenieść oocyty/zarodki na dno roztworu TS, używając pipety.
- Kroki 9–12 należy wykonywać w temperaturze pokojowej (22–27°C).
- W temperaturze pokojowej: W sposób aseptyczny nanieść jedną (1) kroplę roztworu DS o objętości 50 µl na sterylną szalkę Petriego (patrz schemat dla produktu Cryolock, Ryc. 2).

9. Przenieść oocyty/zarodki do roztworu DS i inkubować przez 4 minuty. Aby zagwarantować dokładne przepłukanie oocytów/zarodków roztworem DS, należy ostrożnie pobrać je pipetą i ponownie podać do roztworu.

UWAGA: Podczas ekspozycji na roztwór DS oocyty/zarodki będą skurczone.

10. Podczas 4-minutowej inkubacji w roztworze DS należy w sposób aseptyczny nanieść dwie (2) krople roztworu WS (WS1, WS2) o objętości 50 µl, tak jak to przedstawiono na schemacie.
 11. Przenieść oocyty/zarodki do kroplek WS1, a następnie do kroplek WS2; inkubować po 4 minuty w każdej kropelce, nie zakłócając ich.
- UWAGA: Podczas inkubacji w roztworze WS oocyty/zarodki powinny powiększyć się do pierwotnego rozmiaru w ciągu 2–3 minut.
12. Przed rozpoczęciem dalszych procedur ogrzane OOCYTY należy przenieść do wstępnie zrównoważonej pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 20% (steż. obj.) lub 12 mg/ml w celu ich zregenerowania (inkubować 2–3 godziny, aby umożliwić ponowne utworzenie wrzeciona).

Z ogrzanyimi ZARODKAMI można postępować na dwa sposoby:

- a) W celu bezwzględnego przeniesienia zarodka do ciała pacjentki: przenieść ZARODKI do wstępnie zrównoważonej pożywki „transportowej” z dodatkiem białka w stężeniu 20% (steż. obj.) lub 12 mg/ml.
- b) W celu prowadzenia dalszej hodowli: przenieść ZARODKI do wstępnie zrównoważonej pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 20% (steż. obj.) lub 12 mg/ml i inkubować przez 4 godziny w celu ich zregenerowania. Po okresie regeneracji przenieść ZARODKI do pożywki hodowlanej z dodatkiem białka w stężeniu 10% (steż. obj.) i inkubować do momentu osiągnięciażądanego stadium rozwojowego w celu przeniesienia zarodka do ciała pacjentki.

Szczegółowe informacje o wykorzystaniu tych produktów należy zweryfikować w wewnętrznych procedurach oraz protokołach laboratorium, które opracowano i zoptymalizowano pod kątem poszczególnych programów medycznych.

INSTRUKCJA DOTYCZĄCE PRZECZYSZCZANIA I STABILNOŚCI

Nieotwarte butelki przechowywać w chłodziarce w temperaturze od 2 do 8°C. Przy przechowywaniu roztworów zestawu Vitrification Thaw Kit zgodnie ze wskazówkami pozostają one stabilne do upływu terminu ważności podanego na etykietach fiolek.

Po otwarciu fiolek należy zużyć pożywkę w ciągu ośmiu (8) tygodni.

Ze względu na to, że w produkcie obecny jest materiał pochodzenia ludzkiego, podczas przechowywania produktu mogą wytrącić się cząstki stałe. Nie stwierdzono, aby ten typ cząstek stałych negatywnie wpływał na właściwości produktu.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Wyrób ten jest przeznaczony do użytku przez personel przeszkolony w procedurach wspomaganego rozrodu. Procedury te obejmują sposób wykorzystania wyrobu zgodnie z jego przeznaczeniem.

Ośrodek użytkownika, w którym stosowany jest ten wyrób, odpowiada za zachowanie identyfikowalności produktu i musi postępować zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi identyfikowalności, jeśli mają one zastosowanie.

Nie używać żadnej fiołki z roztworem, która wygląda na uszkodzoną, przecieka, jeśli w roztworze obecne są cząstki stałe lub zmętnienie oraz jeśli roztwór zmienił kolor. Zutilizować produkt zgodnie z obowiązującymi przepisami.

W celu uniknięcia problemów związanych z zanieczyszczeniem z produktem należy obchodzić się, stosując techniki aseptyczne.

Z dostępnej obecnie literatury naukowej wynika, że wciąż nie jest znany długoterminowy wpływ wityfikacji na oocyty i zarodki.

Nie korzystać z butelek, w przypadku których sterylne opakowanie zostało naruszone.

UE: Standardowe środki zapobiegania zakażeniom wynikającym z używania produktów leczniczych przygotowanych z ludzkiej krwi lub osocza obejmują dobór dawców, badania przesiewowe pojedynczych donacji krwi i pul osocza pod względem swoitych znaczników zakażeń oraz stosowanie skutecznych kroków w produkcji w celu inaktywacji/usuwania wirusów. Mimo to podczas podawania produktów leczniczych wyprodukowanych z krwi lub osocza ludzkiego nie można całkowicie wykluczyć możliwości przeniesienia czynników zakaźnych. Odnosi się to także do nieznanych lub rozwijających się wirusów bądź innych patogenów. Nie ma żadnych doniesień o potwierdzonym przeniesieniu wirusów dla albuminy wytwarzanej w ustalonym procesie, zgodnie ze specyfikacjami Farmakopei Europejskiej. Zdecydowanie zalecane jest, by każdorazowo — podczas podawania pacjentce produktów firmy Irvine Scientific, LLC związanych z pożywkami do hodowli komórek rozrodczych — zapisać nazwę i numer serii produktu, aby zachować powiązanie pomiędzy pacjentką a serią produktu, który otrzymała.

USA: Ten produkt zawiera albuminę surowicy ludzkiej (HSA). Materiał pochodzenia ludzkiego użyty do wyprodukowania tego produktu był testowany przy użyciu zestawów licencjonowanych przez Agencję ds. Żywności i Leków oraz określono, że nie wykazuje on reakcji na przeciwciała przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV) ani na przeciwciała przeciw ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV). Jednakże żadna z metod testowych nie oferuje całkowitej pewności, że produkty pochodzenia ludzkiego nie są zakażone. Ze wszystkimi produktami pochodzenia ludzkiego należy postępować tak, jakby mogły przenieść one zakażenie, stosując uniwersalne środki ostrożności. Dawcy tych materiałów źródłowych zostali także przebadani na obecność choroby Creutzfeldta-Jacoba (CJD).

PRZECIWSKAZANIE

Produkt zawiera sarszan gentaminy. Należy zastosować odpowiednie środki ostrożności w celu upewnienia się, że pacjentka nie jest uczulona na tego rodzaju antybiotyki.

AVERTIZARE UE: Numai pentru uz profesional.

INDICAȚIE DE UTILIZARE

Vit Kit-Thaw (Trusă de decongelare după vitrificare) este destinat utilizării în decongelarea ovocitelor vitrificate (MI), a zigotilor pronucleari (PN) pentru embrioni în stadiul de clivaj până în ziua 3 și a embrionilor în stadiul de blastocist care au fost vitrificați utilizând Vitrification Freeze Kit (Trusa de congelare după vitrificare) (Catalog #90133-SO)

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

Thawing Solution-TS este o soluție tamponată cu HEPES de Medium-199 care conține sulfat de gentamicină, 1,0 M sucroză și 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS este o soluție tamponată cu HEPES de Medium-199 care conține sulfat de gentamicină, 0,5 M sucroză și 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS este o soluție tamponată cu HEPES de Medium-199 care conține sulfat de gentamicină și 20 % (v/v) DSS.

DSS este un supliment proteic care constă în 50 mg/ml de albumină serică umană (HSA) de puritate terapeutică și 20 mg/ml de dextran. DSS este utilizat la 20 % (v/v) în Vit Kit-Thaw pentru o concentrație finală de 10 mg/ml HSA și 4 mg/ml de dextran.

Aceste trei soluții vor fi folosite în ordinea corespunzătoare, conform protocolului etapizat de încălzire a micropicăturilor.

COMPOZIȚIE

<u>Săruri și ioni</u>	Amidă de acid nicotinic	<u>Sursă de proteine</u>	Prolină	<u>Altul</u>
Clorură de sodiu	Acid pantotenic	Albumină serică umană	Tirozină	Guanină
Fosfat de sodiu	Riboflavină	<u>Soluții tampon</u>	Alanină	Hipoxantină
Clorură de potasiu	Piridoxină	Carbonat acid de sodiu	Acid aspartic	Timină
Sulfat de magneziu	Tiamină	HEPES	Acid glutamic	Uracil
Acetat de sodiu	Biotină	<u>Indicator pH</u>	Izoleucină	Xantină
Clorură de calciu	Alfa-tocoferol	Roșu de fenol	Leucină	Adenozină
Azotat de fier	Bisulfid de sodiu	<u>Macromolecule</u>	Metionină	Sulfat de adenină
Clorură de colină	<u>Antioxidant</u>	Zaharoză	Fenilalanină	Deoxiriboză
<u>Vitamine și minerale</u>	Glutition	Dextran	Serină	Riboză
Acid ascorbic	<u>Antibiotic</u>	<u>Aminoacizi</u>	Treonină	<u>Apă</u>
Acid aminobenzoic	Sulfat de gentamicină	Arginină	Triptofan	Calitate WFI (water for injection - apă pentru preparate injectabile)
Calciferol	<u>Substraturi energetice</u>	Glicină	Cisteină	
Acid folic	Glucoză	Histidină	Hidroxiprolină	
Acid nicotinic	Inozitol	Lizină	Cistină	

ASIGURAREA CALITĂȚII

Soluțiile din Vit Kit-Thaw sunt filtrate prin membrană și prelucrate aseptice conform unor procese de fabricație validate.

Fiecare lot de Vit Kit-Thaw este supus următoarelor teste:

Soluții:

Endotoxină prin metoda Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Analiza embrionului de soarece (o celulă) (≥ 80 % blastocist expandat)

Sterilitatea prin testul de sterilitate actual prevăzut de Farmacopeea Americană <71> (reusit)

Toate rezultatele se înregistrează într-un Certificat de analiză separat pentru fiecare lot, care este disponibil la cerere.

PENTRU ÎNCĂLZIREA PAIETEI CRYOTIP UTILIZATE CA SUPORT:

MATERIALE CARE SUNT NECESARE, DAR NU SUNT INCLUSE

- Conector (Catalog #40736) sau adaptor
- Vase Petri sterile (50 X 9 mm, Falcon 351006 sau echivalent)
- Mănuși de unică folosință
- Seringă Hamilton GASTIGHT® (50 μ L) catalog #80901
- Pipete de transfer (pipete Pasteur din sticlă sau vârfuri de micropipete cu un diametru interior al vârfului de ~ 200 μ m)
- Pensetă
- Cronometru sau temporizator
- Rezervor de azot lichid (recipient Dewar sau din polistiren cu capac, volum 1-2 l)
- Azot lichid (volum suficient pentru a obține o adâncime de 4 inci (10 cm) în rezervor)
- Foarfece ascuțit (steril)
- Baie de apă la 37 °C
- Mediu de cultură cu proteine, preechilibrat la 37 °C într-un incubator cu CO₂ înainte de procedura de decongelare
- Incubator la 37 °C fără CO₂ sau placă de încălzire.

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Componente Vit Kit-Thaw (la fiecare aplicație):

- 50 μ L de Thawing Solution-TS
- 50 μ L de Dilution Solution-DS
- 100 μ L de Washing Solution-WS
- 1 conector

PROTOCOL DE ÎNCĂLZIRE

(PENTRU OVOCITE ȘI EMBRIONI):

- NOTĂ: Procedurile se vor realiza la temperatura camerei (20-27 °C). NU folosiți placa încălzită a microscopului pentru procedurile de mai jos.
- AVERTIZARE: Reduceți la minimum expunerea specimenului la lumină în timpul manipulărilor în soluțiile de decongelare.
1. Aduceți la temperatura camerei (20-27 °C) cantitatea de TS, DS și WS pe care o veți folosi înainte de încălzirea speciemenelor vitrificate.
NOTĂ: Evitați aducerea la temperatura camerei în mod repetat a fiolelor întregi de TS, DS și WS, când este nevoie de o cantitate mică de soluție de fiecare dată. Este mai bine să repartizați în părți alicote cantitatea pe care o veți folosi și să readuceți fiolele la 2-8 °C imediat după repartizarea în părți alicote.
 2. Umpleți rezervorul de azot lichid cu azot lichid (umplere ~80 %) și așezați-l în apropierea congelatorului cu LN₂ care conține speciemenele care urmează să fie decongelate.
 3. Scoateți tijele cu cupеле care conțin paietele CryoTip cu speciemenele vitrificate din vasul de depozitare cu azot lichid și transferați-le în rezervorul umplut cu azot lichid.
AVERTIZARE: Asigurați-vă că paietele CryoTip rămân scufundate în LN₂ (în cupă) în timpul transferului din vasul de depozitare în rezervorul cu LN₂, pentru a preveni decongelarea necontrolată a speciemenelor.
Așezați rezervorul în apropierea microscopului pentru manipularea rapidă.
 4. Etichetați un vas (sau capac) Petri steril cu informațiile necesare.
 5. Răsturnați ușor fiecare fiolă de TS, DS și WS de două ori pentru a amesteca conținutul înainte de utilizare.
 6. Pregătiți vasul cu picături de soluții pentru protocolul de încălzire, după cum urmează:
Distribuiți aseptice o secvență de 2 micropicături pe un capac întors al unui vas Petri, așa cum se arată în figura 1, și așezați vasul pe placa microscopului:
 - o picătură de -50 µl de TS
 - o picătură de -50 µl de DS
 - (Două picături de WS vor fi pregătite ulterior, la pasul 11)
 7. Așezați baia de apă la 37 °C în apropierea microscopului. Trebuie să aveți la îndemână următoarele: o pipetă de transfer și vârfuri, foarfece ascuțit steril, seringă Hamilton și lavete sterile.
 8. Utilizând penseta (sau cleștele), extrageți o paietă CryoTip din tija scufundată în azot lichid, scufundați rapid paieta CryoTip în baia de apă la 37 °C (≥ 500 ml) și agitați ușor timp de 3 secunde pentru încălzire (vezi figura 2) la + 24.000 °C/min.
 9. Distribuiți rapid conținutul paietei CryoTip după cum urmează (vezi figura 3):
 - Uscați rapid paieta CryoTip cu o lavetă sterilă
 - Îndepărtați manșonul metalic de protecție
 - Taiati sigiliul de pe capătul lat al paietei CryoTip la gradația a 4-a
 - Atașați capătul lat al paietei CryoTip bine fixat la seringă Hamilton sau la un instrument de aspirare corespunzător, utilizând un conector sau un adaptor.
NOTĂ: Ridicați pistonul seringii aproximativ 0,5 inch (1,3 cm) înainte de a atașa seringă la conector și la paieta CryoTip.
 - Uscați vârful fin prin ștergere ușoară cu o lavetă sterilă.
 - Cu paieta CryoTip poziționată peste vasul de decongelare pregătit, tăiați rapid sigiliul de la gradația a 2-a a vârfului fin și distribuiți conținutul paietei CryoTip sub forma unei mici picături (~ 1 µl) într-o zonă uscată a vasului, deasupra picăturii de TS (vezi figura 4).
NOTĂ: EVITAȚI FORMAREA DE BULE ATUNCI CÂND DISTRIBUIȚI CONȚINUTUL.
 10. Înglobați picătura de TS în conținutul paietei CryoTip și permiteți amestecul treptat timp de 1 minut (vezi figura 4).
NOTĂ: speciemenele se vor contracta și vor pluti la suprafața picăturii.
NOTĂ: după fiecare transfer al specimenului/specimenelor, eliminați orice reziduuri de lichid din pipeta de transfer și extrageți puțină soluție din următoarea picătură înainte de următoarea manipulare. Evitați formarea de bule în timpul transferurilor.
 11. Extrageți o cantitate mică de DS în pipeta de transfer și transferați specimenul/specimenele din picătura de TS cu un volum minim în picătura de DS, timp de 4 minute.
NOTĂ: Specimenul va rămâne contractat în timpul expunerii la DS.
ÎN ACEST TIME, PREGĂTIȚI CELE DOUĂ PICĂTURI DE 50 µl DE WS (WS1, WS2), AȘA CUM SE ARATĂ ÎN FIGURA 4.
 12. Transferați specimenul/specimenele în picătura de WS (WS1) timp de 4 minute.
NOTĂ: Specimenul/specimenele ar trebui să se extindă din nou la dimensiunea inițială odată aflate în WS timp de 2-3 minute.
 13. Apoi transferați specimenul/specimenele în a doua picătură de WS (WS2) timp de 4 minute.
 14. Transferați OVOCITELE/OVOCITELE încălzite într-un mediu de cultură preechilibrat cu supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml pentru recuperare (2-3 ore pentru a permite reformarea fusului de diviziune) înainte de manipularile ulterioare.
Există două opțiuni pentru EMBRIONUL/EMBRIONII încălziti:
 - a) Pentru transferul imediat la pacient: transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediul de transfer preechilibrat care conține supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml.
 - b) Pentru o cultură ulterioară: transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediul de cultură preechilibrat care conține supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml și lăsați-i o perioadă de recuperare de 4 ore. După perioada de recuperare, transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediul de cultură cu 10 % (v/v) proteine și incubați corespunzător până când se atinge stadiul de dezvoltare dorit pentru transferul la pacient.

PENTRU ÎNCĂLZIREA DISPOZITIVULUI HSV UTILIZAT CA SUPORT:

MATERIALE CARE SUNT NECESARE, DAR NU SUNT INCLUSE

- Vas steril cu 4 godete (Nunc 179830, 144444 sau echivalent) sau vas de cultură pentru organe (BD Falcon 353037)
- Mănuși de unică folosință
- Pipete de transfer
- Pensetă
- Cronometru sau temporizator
- Rezervor cu azot lichid
- Azot lichid
- Foarfece, clește Knipex sau alt tip de dispozitiv de tăiere a sârmei
- Mediu de cultură cu proteine, preechilibrat la 37 °C într-un incubator cu CO₂ înainte de procedura de decongelare
- Incubator la 37 °C fără CO₂ sau placă de încălzire.

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Componente Vit Kit-Thaw (la fiecare aplicație):

- 250 μ l de Thawing Solution-TS
- 50 μ l de Dilution Solution-DS
- 100 μ l de Washing Solution-WS

PROTOCOL DE ÎNCĂLZIRE

(PENTRU OVOCITE ȘI EMBRIONI):

NOTĂ: Pașii de încălzire presupun scufundarea dispozitivului în TS la 37 °C și apoi diluarea și spălarea în DS și WS la temperatura camerei

1. Pregătiți vasele de încălzire (așa cum se arată în diagrama dispozitivului HSV):
 - La 37 °C: Distribuți aseptice 250 μ l de TS într-un vas steril cu 4 godete sau un vas de cultură pentru organe și introduceți vasul într-un incubator fără CO₂ la 37 °C sau așezați-l pe o placă de încălzire cel puțin 30 de minute înainte de procedura de încălzire
- NOTĂ: Pentru ovocite, distribuți cel puțin 1 ml de TS.
2. Identificați paieta/paietele HSV care trebuie să fie încălzite din vasul de depozitare cu LN₂ și transferați-le rapid în rezervorul umplut cu LN₂ în pregătirea pentru procedura de încălzire.
3. Așezați rezervorul cu LN₂ în apropierea microscopului pentru manipularea ulterioară rapidă.
4. Scoateți vasul cu TS din incubatorul la 37 °C sau îndepărtați-l de pe placa de încălzire și puneți-l sub obiectivul microscopului deasupra plăcii microscopului.
5. Ridicați paieta suficient pentru a expune tija de manevrare colorată. Asigurați-vă că mențineți capătul cu specimenul/specimenele scufundat în LN₂.
6. Utilizați un clește Knipex (sau un alt dispozitiv de tăiere a sârmei) pentru a tăia paieta la înălțimea tijei de manevrare colorate. Ghidajul de culoare roșie pentru lungimea de tăiere de pe cleștele Knipex trebuie să fie poziționat la lungimea maximă sau să fie îndepărtat.
 - În mod alternativ, rotiți paieta cu degetele în timpul efectuării mișcărilor de tăiere cu foarfecele, la 10 mm sub partea superioară a tijei de manevrare colorate.
7. Cu o mișcare rapidă dar controlată, prindeți repede tija de manevrare și extrageți-o din picătură.
8. Scufundați imediat șanțul paietei în TS la 37 °C și agitați ușor pentru ca speciemenele să se desprindă de dispozitiv și lăsați-l timp de 1 minut.

Pașii 9-12 trebuie efectuați la temperatura camerei (22-27 °C).

- La temperatura camerei: Distribuți aseptice (1) picătură de 50 μ l de DS într-un vas Petri steril.

9. Extrageți o cantitate mică de DS în pipeta de transfer și transferați specimenul/specimenele din picătura de TS cu un volum minim în picătura de DS, timp de 4 minute.

NOTĂ: Specimenul va rămâne contractat în timpul expunerii la DS.

ÎN ACEST TIMP, PREGĂTIȚI CELE DOUĂ PICĂTURI DE 50 μ l DE WS (WS1, WS2), AȘA CUM SE ARATĂ ÎN DIAGRAMA DISPOZITIVULUI HSV.

10. Transferați specimenul/specimenele în picătura de WS (WS1) timp de 4 minute.

NOTĂ: Specimenul/specimenele ar trebui să se extindă din nou la dimensiunea inițială odată aflate în WS timp de 2-3 minute.
 11. Apoi transferați specimenul/specimenele în a doua picătură de WS (WS2) timp de 4 minute.
 12. Transferați OVOCITUL/OVOCITELE încălzite într-un mediu de cultură preechilibrat cu supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml pentru recuperare (2-3 ore pentru a permite reformarea fusului de diviziune) înainte de manipulările ulterioare.
- Există două opțiuni pentru EMBRIONUL/EMBRIONII încălziti:
- a) Pentru transferul imediat la pacient: transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediul de transfer preechilibrat care conține supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml.
 - b) Pentru o cultură ulterioară: transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediul de cultură pre-echilibrat care conține supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml și lăsați-i o perioadă de recuperare de 4 ore. După perioada de recuperare, transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediul de cultură cu 10 % (v/v) proteine și incubați corespunzător până când se atinge stadiul de dezvoltare dorit pentru transferul la pacient.

NOTĂ: Ovocitele recuperate trebuie să fie fertilizate prin metoda ICSI pentru fertilizare optimă după vitrificare.

PENTRU ÎNCĂLZIREA PAIETEI CRYOLOCK™ UTILIZATE CA SUPORT:

MATERIALE CARE SUNT NECESARE, DAR NU SUNT INCLUSE

- Vas steril cu 4 godete sau vase Petri mici (35 X 10 mm sau echivalent)
- Mănuși de unică folosință
- Pipete de transfer
- Cronometru sau temporizator
- Rezervor cu azot lichid
- Azot lichid
- Mediu de cultură cu proteine, preechilibrat la 37 °C într-un incubator cu CO₂ înainte de procedura de decongelare.
- Incubator la 37 °C fără CO₂ sau placă de încălzire.
- Forceps

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Componente Vit Kit-Thaw (la fiecare aplicație):

- 1 ml de Thawing Solution-TS
- 50 μ l de Dilution Solution-DS
- 100 μ l de Washing Solution-WS

PROTOCOL DE ÎNCĂLZIRE

NOTĂ: Pașii de încălzire presupun scufundarea dispozitivului în TS la 37 °C și apoi diluarea și spălarea în DS și WS la temperatura camerei

1. Pregătiți vasul de decongelare (așa cum se arată în diagrama Cryolock, figura 1):
 - La 37 °C: Distribuți aseptice un volum minim de 1 ml de TS și încălziți la 37 °C într-un incubator fără CO₂ sau pe o placă de încălzire timp de cel puțin 30 de minute înainte de a începe procedura de încălzire.
2. Identificați proba/probele Cryolock care trebuie să fie încălzite și transferați-le rapid din vasul de depozitare cu LN₂ într-un rezervor de reținere umplut cu LN₂ în pregătirea procedurii de încălzire.

3. Puneți rezervorul de reținere umplut cu LN₂ în imediată apropiere a zonei de lucru și a plăcii microscopului pentru a obține o manipulare ulterioară rapidă din rezervor în TS.
4. Scoateți vasul cu TS din incubatorul la 37 °C sau îndepărtați-l de pe placa de încălzire și puneți-l sub obiectivul microscopului deasupra plăcii microscopului.
5. Utilizând forcepsul, țineți capătul superior al corpului Cryolock cu eticheta de identificare orientată în sus.
Opțiunea A: Îndepărtați rapid dar ușor capacul în LN₂, răscind până când acesta se desface.
Opțiunea B: Scoateți rapid Cryolock din LN₂, apoi îndepărtați rapid capacul prin răscuire ușoară.

NOTĂ: Laboratorul trebuie să își consulte propriile proceduri și protocoale. Opțiunea A nu a fost aprobată pentru a fi utilizată în S.U.A.

6. Scufundați imediat vârful concav al Cryolock, cu specimenul/specimenele orientate în sus, în TS la 37 °C. Sub observare la microscop, mișcați ușor Cryolock până când specimenul/specimenele se desprind de vârf.
7. Lăsați specimenul/specimenele în TS timp de 1 minut în total.
8. La treizeci (30) de secunde după scufundarea inițială, preluați ușor cu pipeta specimenul/specimenele dacă plutesc și așezați-le pe fundul TS.

Pașii 9-12 trebuie efectuați la temperatura camerei (22-27 °C).

- La temperatura camerei: Distribuți aseptice (1) picătură de 50 µl de DS într-un vas Petri steril (vezi diagrama Cryolock, figura 2).
9. Transferați specimenul/specimenele în DS și lăsați-le timp de 4 minute. Picurați ușor cu pipeta pe specimene o singură dată ca să vă asigurați că le clătiți complet în DS.

NOTĂ: Specimenul va rămâne contractat în timpul expunerii la DS.

10. În timpul celor 4 minute de expunere în DS, distribuți aseptice două (2) picături de 50 µl de WS (WS1, WS2) așa cum se arată în diagramă

11. Transferați specimenul/specimenele în WS1, apoi în WS2 și lăsați-le câte 4 minute în fiecare, fără a le agita.

NOTĂ: Specimenul/specimenele ar trebui să se extindă din nou la dimensiunea inițială odată aflate în WS timp de 2-3 minute.

12. Transferați OVOCITUL/OVOCITELE încălzite într-un mediu de cultură preechilibrat cu supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml pentru recuperare (2-3 ore pentru a permite reformarea fusului de diviziune) înainte de manipulările ulterioare.

Există două opțiuni pentru EMBRIONUL/EMBRIONII încălziți:

- a) Pentru transfer imediat la pacient: transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediu de „transfer” preechilibrat care conține supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml.
- b) Pentru o cultură ulterioară: transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediu de cultură pre-echilibrat care conține supliment proteic 20 % (v/v) sau 12 mg/ml și lăsați-i o perioadă de recuperare de 4 ore. După perioada de recuperare, transferați EMBRIONUL/EMBRIONII în mediu de cultură cu 10 % (v/v) proteine și incubați corespunzător până când se atinge stadiul de dezvoltare dorit pentru transferul la pacient.

Pentru detalii suplimentare privind folosirea acestor produse, fiecare laborator trebuie să își consulte propriile proceduri și protocoale, care au fost elaborate și optimizate special pentru programul dvs. medical individual.

INSTRUCȚIUNI PENTRU PĂSTRARE ȘI STABILITATE

Păstrați fiolele nedeschise refrigerate la temperaturi între 2 și 8 °C. Când sunt depozitate conform instrucțiunilor, soluțiile Vit Kit-Thaw sunt stabile până la data expirării indicată pe etichetele fiolelor.

Nu folosiți mediile mai mult de opt (8) săptămâni odată ce recipientele au fost deschise.

Deoarece în produs este prezent material din surse umane, el poate forma o anumită cantitate de urme de particule în cursul depozitării. Nu se cunoaște ca aceste urme de particule să aibă efect asupra performanței produsului.

PRECAUȚII ȘI AVERTISMENTE

Acest dispozitiv este conceput pentru a fi utilizat de către personal instruit în proceduri de reproducere asistată. Aceste proceduri includ întrebuințarea pentru care este conceput acest dispozitiv.

Instituția care utilizează acest dispozitiv este responsabilă pentru menținerea trasabilității produsului și trebuie să respecte normele naționale referitoare la trasabilitate, când este cazul.

Nu utilizați fiole de soluție care prezintă deteriorări, scurgeri, urme de particule în suspensie, care este tulbure sau și-a modificat culoarea. Eliminați produsul în conformitate cu reglementările aplicabile.

Pentru a evita problemele legate de contaminare, manevrați folosind tehnici aseptice.

În prezent, literatura de specialitate arată că efectele pe termen lung ale vitrificării asupra ovocitelor și embrionilor rămân necunoscute.

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

UE: Măsurile standard de prevenire a infecțiilor care apar din cauza folosirii produselor medicinale preparate din sânge uman sau plasmă umană presupun selectarea donatorilor, analizarea donațiilor individuale și a băncilor de plasmă pentru depistarea markerilor specifici de infecții și includerea unor etape de fabricație eficiente pentru anihilarea/eliminarea virusurilor. În ciuda acestora, când se administrează produse medicale preparate din sânge uman sau plasmă umană, posibilitatea de a se transmite agenți infecțioși nu poate fi exclusă în totalitate. Acest lucru este valabil și pentru virusurile necunoscute sau noi și alți agenți patogeni. Nu s-au raportat cazuri de transmitere dovedită de virusuri prin albumină fabricată prin procedee convenționale în conformitate cu specificațiile Farmacopeei Europene. Recomandăm insistent ca, de fiecare dată când se administrează unui pacient produse de tip medii de cultură pentru proceduri de reproducere Irvine Scientific, LLC, să se consemneze numele și numărul de lot al produsului, pentru a menține o legătură între pacient și lotul produsului.

SUA: Acest produs conține albumină serică umană (HSA). Materialul din surse umane folosit la fabricarea acestui produs a fost testat cu ajutorul truselor autorizate de FDA (Food and Drug Administration - Agenția pentru alimente și medicamente) și s-a constatat că nu este reactiv la anticorpii împotriva virusului hepatitei C (HCV) și la anticorpii împotriva virusului imunodeficienței umane (HIV). Cu toate acestea, nicio metodă de testare nu oferă siguranța deplină că produsele derivate din surse umane nu sunt infecțioase. Manevrați toate materialele din surse umane ca și cum ar putea să transmită infecții, aplicând măsurile de precauție general valabile. Donatorilor de materiale sursă le-au fost efectuate analize și pentru depistarea bolii Creutzfeldt-Jakob (CJD).

CONTRAINDICAȚII

Produsul conține sulfat de gentamicină. Trebuie luate măsurile de precauție adecvate pentru a vă asigura că pacientul nu este alergic la acest antibiotic.

EU – OBS! Endast för professionellt bruk.

INDIKATIONER

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) är avsett att användas för upptining av vitrifierade oocyter (MI), prokärna-zygoter (PN) t.o.m. embryon i klyvningsfas dag 3 och embryon i blastocyststadium, som har vitrifierats med användning av Vitrification Freeze Kit (katalognr 90133-SO)

PRODUKTBESKRIVNING

Thawing Solution-TS är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 som innehåller gentamicinsulfat, 1,0 M sukros och 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 som innehåller gentamicinsulfat, 0,5 M sukros och 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 som innehåller gentamicinsulfat och 20 % (v/v) DSS.

DSS är en proteintillsats bestående av 50 mg/ml humant serumalbumin (HSA) av terapeutisk kvalitet samt 20 mg/ml dextran. DSS används vid 20 % (v/v) i Vit Kit-Thaw för en slutlig koncentration på 10 mg/ml HSA och 4 mg/ml dextran.

Dessa tre lösningar ska användas i ordningsföljd enligt protokollet för stegvis uppvärmning av mikrodroppar.

SAMMANSÄTTNING

<u>Salter och joner</u>	Niacin	<u>Proteinkälla</u>	Lysin	Hydroxiprolin
Natriumklorid	Pantotensyra	Humant serumalbumin	Prolin	Cystin
Natriumfosfat	Riboflavin	<u>Bufferter</u>	Tyrosin	<u>Övrigt</u>
Kaliumklorid	Pyridoxin	Natriumbikarbonat	Alanin	Guanin
Magnesiumsulfat	Tiamin	HEPES	Asparaginsyra	Hypoxantin
Natriumacetat	Biotin	<u>pH-indikator</u>	Glutaminsyra	Tymin
Kalciumklorid	Alfa-tokoferol	Fenolrött	Isoleucin	Uracil
Ferrinitrat	Natriumbisulfid	<u>Makromolekyler</u>	Leucin	Xantin
Kolinklorid	<u>Antioxidant</u>	Sukros	Metionin	Adenosin
<u>Vitaminer och mineraler</u>	Glutation	Dextran	Fenylalanin	Adenosinsulfat
Askorbinsyra	<u>Antibiotikum</u>	<u>Aminosyror</u>	Serin	Deoxiribos
Aminobensoesyra	Gentamicinsulfat	Arginin	Treonin	Ribos
Kalciferol	<u>Energisubstrat</u>	Glycin	Tryptofan	<u>Vatten</u>
Folsyra	Glukos	Histidin	Valin	Vatten för injektion (WFI)
Nikotinsyra	Inositol		Cystein	

KVALITETSSÄKRING

Lösningarna i Vit Kit-Thaw är membranfiltrerade och aseptiskt bearbetade enligt validerade tillverkningsförfaranden.

Varje lot Vit Kit-Thaw utsätts för följande tester:

Lösningar:

Endotoxin, med användning av LAL-metod (Limulus Amebocyte Lysate) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Analys av musembryo (en cell) (≥ 80 % expanderad blastocyst)

Sterilitet via aktuellt USP-sterilitetstest <71> (godkänd)

Alla resultat rapporteras på ett lotspecifikt analyscertifikat (Certificate of Analysis) som fås på begäran.

FÖR UPPVÄRMNING AV CRYOTIP SOM BÄRARE:

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Sprutkoppling (katalognr 40736) eller adapter
- Sterila petriskålar (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller motsvarande)
- Engångshandskar
- Hamilton GASTIGHT® spruta (50 µl) katalognr 80901
- Transferpipetter (glaspipetter med utdragen spets eller mikropipettspetsar med en inre spetsdiameter på cirka 200 µm)
- Pincetter
- Tidtagarur eller timer
- Behållare med flytande kväve (förvaringsbehållare eller cellplastbehållare med lock, volym 1–2 l)
- Flytande kväve (av tillräcklig volym för att åstadkomma ett djup på 4 tum (10 cm) i behållaren)
- Vass sax (steril)
- 37 °C vattenbad
- Odlingsmedium med protein, förekvilbrerat till 37 °C i CO₂-inkubator före upptiningsförfarandet
- 37 °C inkubator utan CO₂, eller värmeplatta.

BRUKSANVISNING

Vit Kit-Thaw-komponenter (per applikation):

- 50 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS
- 1 sprutkoppling

UPPVÄRMNINGSPROTOKOLL

(FÖR OOCYTER OCH EMBRYON):

- ANM: Procedurerna måste utföras vid rumstemperatur (20–27 °C). Uppvämt korsbord på mikroskop får INTE användas till följande procedurer.
- FÖRSIKTIGHET!** Minimera exponering av preparaten för ljus under manipulering i upptättningslösningarna.
- Låt de volymer av TS, DS och WS som ska användas uppnå rumstemperatur (20–27 °C) före uppvärmning av vitrifierade preparat.
ANM: Undvik att upprepade gånger låta hela ampullerna med TS, DS och WS uppnå rumstemperatur när bara en liten mängd av lösningen behövs varje gång. Det är bättre att alkivoterat den volym som ska användas och genast sätta tillbaka ampullerna i kylskåpet vid 2–8 °C efter alkivoting.
 - Fyll behållaren för flytande kväve med flytande kväve (tills den är cirka 80 % full) och placera den nära intill frysen med flytande kväve som innehåller preparaten som ska tinas.
 - Ta ut hållarna med kopporna som innehåller CryoTip med vitrifierade preparat ur förvaringen med flytande kväve och överför dem till behållaren fyllt med flytande kväve.
FÖRSIKTIGHET! Säkerställ att CryoTip förblir nedsänkt i flytande kväve (i koppen) under överföringen från förvaringen till behållaren med flytande kväve så att okontrollerad upptätning av preparaten förhindras.
Placera behållaren nära intill mikroskopet för snabb manipulering.
 - Märk en steril petriskål (eller lock) med nödvändig information.
 - Vänd varje ampull med TS, DS och WS försiktigt två gånger för att blanda innehållet före användning.
 - Förbered en skål med droppar av lösning för uppvärmningsprotokollet på följande sätt:
Dispensera aseptiskt en sekvens med 2 mikrodroppar på ett upp-och-nedvänt lock från en steril petriskål, så som visas i figur 1, och placera skålen på mikroskopets korsbord:
 - en 50 µl-dropp TS
 - en 50 µl-dropp DS
 - (Två droppar WS kommer att dispenserat senare i steg 11)
 - Placera 37 °C-vattenbadet nära intill mikroskopet. Ha följande nära till hands: en transferpipett och spetsar, steril vass sax, Hamilton-spruta och sterila torkdukar.
 - Använd pincett (eller tång) till att ta upp den specifika CryoTip ur hållaren i flytande kväve och sänk snabbt ned CryoTip i 37 °C-vattenbadet (≥ 500 ml) och snurra runt det försiktigt i 3 sekunder för att värma det (se figur 2) med en uppvärmningshastighet på +24 000 °C/min.
 - Dispensera snabbt CryoTip-innehållet på följande sätt (se figur 3):
 - Torka snabbt CryoTip torr med en steril torkduk
 - Avlägsna skyddshylsan av metall
 - Kapa förseglingen i CryoTips breda ände vid markering nr 4
 - Anslut CryoTips breda ände stadigt till Hamilton-sprutan eller ett lämpligt aspireringsinstrument med hjälp av en sprutkoppling eller adapter.
ANM: Lyft upp sprutkolven cirka 0,5 tum (1,3 cm) innan du ansluter sprutan till sprutkopplingen och CryoTip.
 - Torka försiktigt den fina spetsen torr med en steril torkduk.
 - Med CryoTip positionerad över den förberedda upptättnings-skålen, kapa snabbt förseglingen vid markering nr 2 i den fina spetsändan och dispensera CryoTip-innehållet som en liten dropp (cirka 1 µl) på ett torrt område i skålen ovanför TS-droppen (se figur 4).
ANM: UNDVIK BUBBELBILDNING NÄR INNEHÅLLET DISPENSERAS.
 - Sammanför TS-droppen med CryoTip-innehållet och låt blandning ske gradvis under 1 minut (se figur 4).
Anm: Preparaten kommer att krympa ihop och flyta ovanpå droppen.
ANM: Efter varje överföring av preparat, blås ut all kvarvarande vätska ur transferpipetten och dra upp lite lösning från nästa dropp före nästa manipulering. Undvik bubbelbildning under överföringarna.
 - Dra upp lite DS i transferpipetten och överför preparatet(n) från TS-droppen med minimal volym till DS-droppen och låt det(dem) ligga i 4 minuter.
ANM: Preparatet kommer att förbli hopsjunket under exponeringen för DS.
UNDER DENNA TID, DISPENSERA DE TVÅ 50 µl-DROPPARNA AV WS (WS1, WS2), SÅ SOM VISAS I FIGUR 4.
 - Överför preparatet(-en) till WS-droppen (WS1) och låt det(dem) ligga i 4 minuter.
ANM: Preparatet(-en) bör återexpanderas till ursprunglig storlek inom 2–3 minuter i WS.
 - Överför därefter preparatet(-en) till den andra WS-droppen (WS2) och låt det(dem) ligga i 4 minuter.
 - Överför den(de) uppvärmda OOCYTEN(-ERNA) till förekvilbrerat odlingsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml för återhämtning 2–3 timmar så att kärnspolen hinner återskapas före efterföljande manipuleringar.
Det finns två alternativ för uppvärmt(-da) EMBRYO(N):
 - För omedelbar återföring till patienten: Överför EMBRYOT(-NA) till förekvilbrerat överföringsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml.
 - För fortsatt odling: Överför EMBRYOT(-NA) till förekvilbrerat odlingsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml för en 4-timmars återhämtningsperiod. Efter återhämtningsperioden, överför EMBRYOT(-NA) till odlingsmedium med 10 % (v/v) protein och inkubera tills önskat utvecklingsstadium har uppnåtts för återföring till patienten.

FÖR UPPVÄRMNING AV HSV-STRÅ SOM BÄRARE:

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Steril skål med 4 brunnar (Nunc 179830, 144444 eller likvärdig) eller en skål för organodling (BD Falcon 353037)
- Engångshandskar
- Transferpipetter
- Pincetter
- Tidtagarur eller timer
- Behållare med flytande kväve
- Flytande kväve
- Sax, Knipex-tång eller annat verktyg för trådkapning
- Odlingsmedium med protein, förekvilbrerat till 37 °C i CO₂-inkubator före upptättningsförfarandet
- 37 °C inkubator utan CO₂, eller värmeplatta.

BRUKSANVISNING

Vit Kit-Thaw-komponenter (per applikation)

- 250 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

UPPVÄRMNINGSPROTOKOLL

(FÖR OOCYTER OCH EMBRYON):

ANM: Uppvärmningsstegen omfattar nedsänkning av enheten i 37 °C TS och efterföljande spädning och tvättning i DS och WS vid rumstemperatur

1. Gör iordning uppvärmningsskålarna (så som visas i diagrammet för HSV-strå):
 - Vid 37 °C: Dispensera aseptiskt 250 µl TS i en steril skål med 4 brunnar eller en organodlings-skål och placera den i en 37 °C inkubator utan CO₂ eller på en värmeplatta i minst 30 minuter före uppvärmningsproceduren.
- ANM: För oocyter, dispensera minst 1 ml TS.
2. Identifiera det(de) HSV-strå(n) som ska värmas upp från förvaringen i flytande kväve och överför dem snabbt till behållaren fylld med flytande kväve för att förbereda för upptiningsproceduren.
3. Placera behållaren med flytande kväve nära intill mikroskopet för efterföljande snabb manipulering.
4. Ta ut skålen med TS ur 37 °C-inkubatorn eller ta av den från värmeplattan och placera den i fokus på mikroskopets korsbord.
5. Lyft strået så mycket att den färgade hanteringsstaven blir synlig. Säkerställ att änden med preparatet(n) förblir nedsänkt i det flytande kvävet.
6. Använd en Knipex-tång (eller annat trådkapande verktyg) till att kapa strået i höjd med den färgade hanteringsstaven. Den röda kapningslängdguiden på Knipex-tången ska positioneras i det maximala längdläget eller tas bort.
 - Alternativt kan man snurra strået med tummen och fingrarna medan man klipper med en sax, 10 mm under toppen på den färgade hanteringsstaven.
7. Greppa hanteringsstaven med en snabb men kontrollerad rörelse och dra ut den ur strået.
8. Sänk omedelbart ned fåran på hanteringsstaven i 37 °C TS och snurra den försiktigt för att lösgöra preparaten från enheten och lämna kvar den i 1 minut.

Steg 9–12 måste utföras vid rumstemperatur (22–27 °C).

- Vid rumstemperatur: Dispensera aseptiskt en (1) 50 µl-droppe DS i en steril petriskål.
 9. Dra upp lite DS i transferpipetten och överför preparatet(n) från TS-droppen med minimal volym till DS-droppen och låt det(dem) ligga i 4 minuter.
 - ANM: Preparatet kommer att förbli hopsjunket under exponeringen för DS.
 - UNDER DENNA TID, DISPENSERA DE TVÅ 50 µl-DROPPARNA AV WS (WS1, WS2), SÅ SOM VISAS I DIAGRAMMET FÖR HSV-STRÅ.
 10. Överför preparatet(-en) till WS-droppen (WS1) och låt det(dem) ligga i 4 minuter.
 - ANM: Preparatet(-en) bör återexpanderas till ursprunglig storlek inom 2–3 minuter i WS.
 11. Överför därefter preparatet(-en) till den andra WS-droppen (WS2) och låt det(dem) ligga i 4 minuter.
 12. Överför den(de) uppvärmda OOCYTEN(-ERNA) till förekvilbrerat odlingsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml för återhämtning (2–3 timmar så att kärnsolen hinner återskapas) före efterföljande manipuleringar.
- Det finns två alternativ för uppvärmt(-da) EMBRYO(N):
- a) För omedelbar återföring till patienten: Överför EMBRYOT(-NA) till förekvilbrerat överföringsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml.
 - b) För fortsatt odling: Överför EMBRYOT(-NA) till förekvilbrerat odlingsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml för en 4-timmars återhämtningsperiod. Efter återhämtningsperioden, överför EMBRYOT(-NA) till odlingsmedium med 10 % (v/v) protein och inkubera tills önskat utvecklingsstadium har uppnåtts för återföring till patienten.
- ANM: Återhämtade oocyter måste fertiliseras med användning av intracytoplasmatisk spermieinjektion (ICSI) för optimal fertilisering efter vitrifiering.

FÖR UPPVÄRMNING AV CRYOLOCK™ SOM BÄRARE:

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Steril skål med fyra brunnar eller sterila små petriskålar (35 X 10 mm eller motsvarande)
- Engångshandskar
- Transferpipetter
- Tidtagarur eller timer
- Behållare med flytande kväve
- Flytande kväve
- Odlingsmedium med protein, förekvilbrerat till 37 °C i CO₂-inkubator före upptiningsförandet
- 37 °C inkubator utan CO₂ eller värmeplatta
- Tång

BRUKSANVISNING

Vit Kit-Thaw-komponenter (per applikation)

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

UPPVÄRMNINGSPROTOKOLL

ANM: Uppvärmningsstegen omfattar nedsänkning av enheten i 37 °C TS och efterföljande spädning och tvättning i DS och WS vid rumstemperatur

1. Gör iordning upptinings-skålen (så som visas i Cryolock-diagrammet, figur 1):
 - Vid 37 °C: Dispensera aseptiskt en volym på minst 1 ml TS och värm den till 37 °C i en inkubator utan CO₂ eller på en värmeplatta i minst 30 minuter före uppvärmningsproceduren.
2. Identifiera det(de) Cryolock-preparat som ska värmas upp och överför dem snabbt från förvaringen i flytande kväve till en behållare fylld med flytande kväve för att förbereda för uppvärmningsproceduren.

- Placera behållaren fylld med flytande kväve nära intill arbetsytan och mikroskopets korsbord så att den efterföljande förflyttningen från behållaren till TS kan ske snabbt.
- Ta ut skålen med TS ur 37 °C-inkubatorn eller ta av den från värmeplattan och placera den i fokus på mikroskopets korsbord.
- Håll den övre delen av Cryolock med en tång så att den identifierande etiketten är vänd uppåt.
Alternativ A: Ta snabbt men varsamt av locket under flytande kväve genom att vrida delarna tills det lossnar.
Alternativ B: Ta snabbt ut Cryolock ur det flytande kvävet och ta sedan snabbt av locket med en varsam vidrörelse.

ANM: Laboratoriet bör konsultera sina egna rutiner och protokoll. Alternativ A är inte godkänt för användning i USA.

- Sänk omedelbart ned den konkava spetsen på Cryolock, med preparatet(n) vända uppåt, i 37 °C TS-lösningen. Förflytta försiktigt Cryolock under observation i mikroskopet tills preparatet(n) har lösgjorts från spetsen.
- Låt preparatet(-en) ligga i sammanlagt 1 minut i TS-lösningen.
- 30 sekunder efter att preparatet(-en) initialt sänkts ned i TS, pipettera det(dem) varsamt om det(de) flyter och för ner det(dem) till TS-lösningens botten.

Steg 9–12 måste utföras vid rumstemperatur (22–27 °C).

- Vid rumstemperatur: Dispensera aseptiskt en (1) 50 µl-droppe DS i en steril petriskål (se Cryolock-diagrammet, figur 2).
- Överför preparatet(-en) till DS och låt det(dem) ligga i 4 minuter. Pipettera preparaten en gång för att säkerställa att de sköljs fullständigt i DS.

ANM: Preparatet kommer att förlöpa hopsjunket under exponeringen för DS.

- Under den 4 minuter långa exponeringen för DS, dispensera aseptiskt två (2) 50 µl-droppar WS (WS1, WS2) så som visas i diagrammet.
- Överför preparatet(-en) till WS1 och sedan till WS2 för 4 minuter i vardera och låt det(dem) ligga ostörda.

ANM: Preparatet(-en) bör återexpanderas till ursprunglig storlek inom 2–3 minuter i WS.

- Överför den(de) uppvärmda OOCYTEN(-ERNA) till förekvilibrerat odlingsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml för återhämtning (2–3 timmar så att kärnsolen hinner återskapas) före efterföljande manipuleringar.

Det finns två alternativ för uppvärmt(-da) EMBRYO(N):

- För omedelbar återföring till patienten: Överför EMBRYOT(-NA) till förekvilibrerat överföringsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml.
- För fortsatt odling: Överför EMBRYOT(-NA) till förekvilibrerat odlingsmedium med 20 % (v/v) proteintillsats eller 12 mg/ml för en 4-timmars återhämtningsperiod. Efter återhämtningsperioden, överför EMBRYOT(-NA) till odlingsmedium med 10 % (v/v) protein och inkubera tills önskat utvecklingsstadium har uppnåtts för återföring till patienten.

För ytterligare information om användning av dessa produkter bör varje laboratorium konsultera sina egna laboratorieförfaranden och -protokoll som utvecklats och optimerats särskilt för det egna medicinska programmet.

FÖRVARINGSANVISNINGAR OCH HÅLLBARHET

Öppnade ampuller ska förvaras i kylskåp vid 2–8 °C. För förvaring enligt anvisningarna är Vitrication Thaw Kit-lösningarna hållbara fram till det utgångsdatum som anges på ampulletiketterna.

Medierna får inte användas under längre tid än åtta (8) veckor efter att behållarna har öppnats.

Eftersom produkten innehåller material av humant ursprung kan partiklar eventuellt bildas under förvaring. Sådana partiklar har inte visats utöva någon effekt på produktens funktion.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Denna produkt är avsedd att användas av personal med utbildning i procedurer för assisterad befruktning. Dessa procedurer innefattar den avsedda tillämpningen som denna produkt är avsedd för.

Den institution där denna produkt används ansvarar för att upprätthålla produktens spårbarhet och måste följa nationella förordningar avseende spårbarhet där så är tillämpligt.

Använd inga ampuller med lösning som uppvisar tecken på skador, läckage, partiklar, grumling eller färgförändring. Kassera produkten enligt gällande bestämmelser.

Använd aseptisk teknik vid hantering, så att kontamination undviks.

Enligt aktuell forskningslitteratur är de långsiktiga effekterna av vitrifiering på oocyter och embryon fortfarande okända.

Flaskor vars sterila förpackning inte är intakt får inte användas.

EU: Standardåtgärder för att förhindra infektion orsakad av användning av medicinska produkter framställda av humant blod eller human plasma inkluderar selektion av givare, screening av individuella donerade enheter och plasmapooler för specifika infektionsmarkörer samt införlivande av effektiva tillverkningssteg för inaktivering/avlägsnande av virus. Trots detta kan risken för överföring av infektiösa agens vid administrering av medicinska produkter framställda av humant blod eller human plasma inte helt uteslutas. Detta gäller även okända eller nya virus och andra patogener. Det finns inga rapporter om bevisad virusöverföring via albumin framställt genom etablerade förfaranden enligt den europeiska farmakopéns specifikationer. Det rekommenderas starkt att anteckna produktens namn och batchnummer varje gång odlingsmedier för assisterad befruktning från Irvine Scientific, LLC administreras till en patient, så att produktbatchen ifråga kan förknippas med patienten.

USA: Denna produkt innehåller humant serumalbumin (HSA). Humant källmaterial som använts vid framställningen av denna produkt har testats med satser licensierade av FDA (Food and Drug Administration i USA), och befunnits vara icke-reaktiva för antikroppar mot hepatit C (HCV) samt antikroppar mot humant immunbristvirus (HIV). Det finns dock ingen testmetod som fullständigt kan garantera att produkter framställda av humant källmaterial inte är infektiösa. Hantera allt material av humant ursprung som om det vore smittförande, med användning av universella försiktighetsåtgärder. Givarna av källmaterialet har också screenats för Creutzfeldt-Jakobs sjukdom.

KONTRAINDIKATIONER

Produkten innehåller gentamicinsulfat. Adekvata försiktighetsåtgärder ska vidtas för att säkerställa att patienten inte är allergisk mot detta antibiotikum.

ELI HOIATUS: ainult professionaalseks kasutamiseks.

NÄIDUSTUS KASUTAMISEKS

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) on mõeldud kasutamiseks vitrifitseeritud ootsüütide (MI), pronukleaarsete (PN) sügootide ning 3. päeva jagunemisfaasis embrüote ja blastotsüsti faasis embrüote sulatamiseks, mis on vitrifitseeritud Vitrification Freeze Kitiga (katalooginr 90133-SO)

SEADME KIRJELDUS

Thawing Solution-TS on HEPES-puhverdatud Medium-199 lahus, mis sisaldab gentamütsiinsulfaati, 1,0 M sahharoosi ja 20% (mahuprotsenti) Dextran Serum Supplementi (DSS).

Dilution Solution-DS on HEPES-puhverdatud Medium-199 lahus, mis sisaldab gentamütsiinsulfaati, 0,5 M sahharoosi ja 20% (mahuprotsenti) DSS-i.

Washing Solution-WS on HEPES-puhverdatud Medium-199 lahus, mis sisaldab gentamütsiinsulfaati ja 20% (mahuprotsenti) DSS-i.

DSS on valgulisand, mis koosneb 50 mg/ml raviainena klassifitseeritud inimese seerumi albumiinist (HSA) ja 20 mg/ml dekstraanist. DSS-i kasutatakse kontsentratsioon 20% (mahuprotsenti) tootes Vit Kit-Thaw, et saada lõppkontsentratsioon 10 mg/ml HSA-d ja 4 mg/ml dekstraani.

Neid lahuseid tuleb kasutada järjest, samm-sammulise mikrotikli-soojendamisprotokoll kohaselt.

KOOSTIS

<u>Soolad ja ioonid</u>	Nikotiinamiid	<u>Valguallikas</u>	Lüsiin	Hüdroksüproliin
Naatriumkloriid	Pantoteenhape	Inimese seerumi	Proliin	Tsüstiin
Naatriumfosfaat	Riboflaviin	albumiin	Türosiin	<u>Muu</u>
Kaaliumkloriid	Püridoksiin	<u>Puhvrid</u>	Alaniin	Guaaniin
Magneesiumsulfaat	Tiamiin	Naatriumvesinikkarbonaat	Asparagiinhape	Hüpoksantiin
Naatriumtsetaat	Biotiin	HEPES	Glutamiinhape	Tümiin
Kaltsiumkloriid	Alfatokoferool	<u>pH-indikaator</u>	Isoleutsiin	Uratsiil
Raudnitraat	Naatriumbisulfit	Fenoolpunane	Leutsiin	Ksantiin
Koliinkloriid	<u>Antikösidant</u>	<u>Makromolekulid</u>	Metioniin	Adenosiin
<u>Vitamiinid ja mineraalid</u>	Glutatioon	Sahharoos	Fenüülalaniin	Adeniinsulfaat
Askorbiinhape	<u>Antibiootikum</u>	Dekstraan	Seriin	Desoksüriboos
Aminobensoehape	Gentamütsiinsulfaat	<u>Aminohapped</u>	Treoniin	Riboos
Kaltsiferool	<u>Energia substraadid</u>	Arginiin	Trüptofaan	<u>Vesi</u>
Foolhape	Glükoos	Glütsiin	Valiin	WFI kvaliteet
Nikotiinhape	Inositol	Histiidiin	Tsüsteiin	

KVALITEEDI TAGAMINE

Vit Kit-Thaw' lahused on membraanfiltratsioon ja töödeldud aseptiliselt valideeritud töötlemisprotsesside kohaselt.

Iga Vit Kit-Thaw' partii läbib järgmised testid.

Lahused:

Endotoksiini määramine limuluse amöbotsüüdi lüsaadi (LAL) meetodil ($\leq 0,6$ EÜ/ml)

Hiire embrüo analüüs (üherakuline, $\geq 80\%$ suurendatud blastotsüst)

Steriilsus kehtiva USP steriilsustestiga <71> (läbitud)

Kõik tulemused on avaldatud konkreetset partiid puudutavas analüüsisertifikaadis, mida võite soovii korral taotleda.

CRYOTIPI KUI KANDJA SOOJENDAMINE

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Liitmik (katalooginr 40736) või adapter
- Steriilsed Petri tassid (50 x 9 mm, Falcon 351006 või samaväärsed)
- Ühekorrakindad
- Hamilton GASTIGHT® süstal (50 µl, katalooginr 80901)
- Ülekandepipetid (klaaspipetid või mikropipettotsakud, mille otsaku siseläbimõõt on ca 200 µm)
- Pintsetid
- Stopper või taimer
- Vedela lämmastiku nõu (Dewar või kaanega vahtplastist nõu, 1–2 l)
- Vedel lämmastik (piisavalt, et nõus oleks seda 4 tolli (10 cm))
- Teravad käärid (steriilsed)
- 37 °C veevann
- Sööde koos valguga, eeltasakaalustatud enne sulatamisprotseduuri temperatuurile 37 °C CO₂ inkubaatoris
- 37 °C inkubaator ilma CO₂ või kuumutusfaasita

KASUTUSJUHE

Vit Kit-Thaw komponendid (kasutuskorra kohta):

- 50 µl Thawing Solution-TS-i
- 50 µl Dilution Solution-DS-i
- 100 µl Washing Solution-WS-i
- 1 liitmik

SOOJENDUSPROTOKOLL

(OOTSÜÜTIDELE JA EMBRÜOTELE)

- MÄRKUS. Protseduure tuleb teha toatemperatuuril (20–27 °C). ÄRGE kasutage järgmiste protseduuride tegemiseks soojendusega mikroskoobialust.
- ETTEVAATUST! Sulatamislahustega manipuleerimise ajal minimeerige proovide kokkupuudet valgusega.
- Enne vitritiseeritud proovide soojendamist laske kasutatavatel TS-i, DS-i ja WS-i kogustel jõuda toatemperatuurile (20–27 °C). MÄRKUS. Kui vajate iga kord vaid väikest lahusekogust, siis ärge tooge terveid TS-i, DS-i ja WS-i viaale korduvalt toatemperatuurile. Parem on kasutatav kogus alikvootida ja viaalid seejärel tagasi 2–8 °C temperatuurile viia.
 - Täitke vedela lämmastiku anum vedela lämmastikuga (u 80% täis) ja asetage see LN₂ külmiku lähedale, kus asuvad sulatatavad proovid.
 - Eemaldage vitritiseeritud proove sisaldavad CryoTipid koos pulkade või keeduklaasidega vedela lämmastiku külmikust ja tõstke vedela lämmastikuga täidetud nõusse. ETTEVAATUST! Jälgige, et üleviimisel külmikust LN₂ nõusse jääksid CryoTipid vedela lämmastiku sisse (keeduklaasis), et hoida ära proovide soovimatu sulamine. Asetage nõu kiireks tegutsemiseks mikroskoobi lähedusse.
 - Sildistage üks steriilne Petri tass (või kaas) vajaliku teabega.
 - Keerake igat TS-i, DS-i ja WS-i viaali õrnalt kaks korda ümber, et sisu enne kasutamist segada.
 - Valmistage tass lahuseetiljadega soojendamisprotseduuriks ette järgmiselt.
Kandke aseptilist tehnikat kasutades steriilse Petri tassi tagurpidi kaanele 2 mikrotilk, nagu on näidatud joonisel 1, ja asetage tass mikroskoobialusele:
 - üks 50 µl TS-i tilk
 - üks 50 µl DS-i tilk
 - (kaks WS-i tilka asetatakse hiljem, sammus 11).
 - Asetage 37 °C veevann mikroskoobi lähedale. Hoidke käepärast järgmised esemed: ülekandepipett ja otsakud, steriilsed teravad käärid, Hamiltoni süstal ja steriilsed vatipadjad.
 - Võtke pintsette kasutades pulgal olev sobiv CryoTip vedelast lämmastikust välja, asetage CryoTip kiirelt 37 °C veevanni (≥ 500 ml) ja keerutage õrnalt 3 sekundit, et seda soojendada (vt joonis 2) soojendamiskiirusel + 24 000 °C/min.
 - Väljutage CryoTipi sisu kiirelt järgmisel viisil (vt joonis 3).
 - Pühkige CryoTip steriilse vatipadjaga kiirelt kuivaks.
 - Eemaldage metallist katteühülss.
 - Lõigake CryoTipi laiema otsa sulgemiskoht tähist 4 juurest lahti.
 - Kinnitage CryoTipi lai ots kindlalt Hamiltoni süstla või sobiliku aspireerimisvahendi külge, kasutades liitmikku või adapterit. MÄRKUS. Tõstke süstla kolvivarrast umbes 0,5 tolli (1,3 cm), enne kui kinnitate süstla liitmiku ka CryoTipi külge.
 - Pühkige peen otsak steriilse vatipadjaga õrnalt kuivaks
 - Asetage CryoTip ettevalmistatud sulatamisnõu kohale, lõigake peene otsa sulgemiskoht 2. tähistuse juurest kiirelt lahti ja asetage CryoTipi sisu väikese tilgana (u 1 µl) nõu kuiva kohta, TS-i tilga kohale (vt joonis 4).
 - MÄRKUS. SISU VÄLJUTAMISEL EI TOHI TEKITADA MULLE.
 - Ühendage TS-i tilk CryoTipi sisuga ja laske neil 1 minuti vältel aegamööda seguneda (vt joonis 4). Märgus. Proovid tõmbuvad kokku ja tõusevad tilga pinnale. MÄRKUS. Pärast igat proovi(de) üleviimist puhuge allesjäänud vedelik ülekandepipetist välja ja tõmmake enne järgmist käsitlemist järgmisest tilgast veidi lahust sisse. Ärge tekitage üleviimise käigus mulle.
 - Tõmmake veidi DS-i ülekandepipetti ja viige proov(id) TS-i tilgast koos minimaalse lisamahuga 4 minutiks DS-i tilga sisse. MÄRKUS. Proov püsib DS-is olles kokkutõmbunud. SELLEL AJAL PANGE VALMIS KAKS 50 µl WS-i TILKA (WS1, WS2), NAGU ON NÄIDATUD JOONISEL 4.
 - Viige proov(id) 4 minutiks WS-i tilga (WS1) sisse. MÄRKUS. Proovid peaksid 2–3 minutiga WS-is olles algsuurusesse tagasi paisuma.
 - Seejärel viige proov(id) 4 minutiks teise WS-i tilga (WS2) sisse.
 - Viige soojendatud OOTSÜÜDID üle varem tasakaalustatud söötmesse koos 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valguisandiga (2–3 tunniks, et rakustruktuur jõuaks taastuda), enne kui alustatakse edasist käsitlemist. Soojendatud EMBÜO(TE) puhul on variante kaks:
 - a) koheseks patsiendile siirdamiseks viige EMBRÜO(D) varem tasakaalustatud ülekandainesse, mis sisaldab 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valguisandit;
 - b) edasiseks kultuurimiseks: viige EMBRÜO(D) 4-tunniseks taastumisperioodiks varem tasakaalustatud söötmele, mis sisaldab 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valguisandit. Pärast taastumisperioodi viige EMBRÜO(D) söötmele koos 10% (mahuprotsenti) valguga ja inkubeerige kuni patsiendile siirdamiseks soovitud arengufaasi saavutamiseni.

HSV-SEADME KUI KANDJA SOOJENDAMINE

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Steriilne 4-kambriline nõu (Nunc 179830, 144444 või samaväärne) või organkultuuri alus (BD Falcon 353037)
- Ühekorrakindad
- Ülekandepipetid
- Pintsetid
- Stopper või taimer
- Vedela lämmastiku nõu
- Vedel lämmastik
- Käärid, Knipex või muu traadilõikamisesead
- Sööde koos valguga, eeltasakaalustatud enne sulatamisprotseduuri temperatuurile 37 °C CO₂ inkubaatoris
- 37 °C inkubaator ilma CO₂ või kuumutusfaasita

KASUTUSJUHE

Vit Kit-Thaw' komponendid (kasutuskorra kohta)

- 250 µl Thawing Solution-TS-i
- 50 µl Dilution Solution-DS-i
- 100 µl Washing Solution-WS-i

SOOJENDUSPROTOKOLL

(OOTSÜÜTIDELE JA EMBRÜOTELE)

- MÄRKUS. Soojendusetaapid hõlmavad vahendi kastmist 37 °C TS-i sisse ning edasist lahjendamist ja loputamist DS-is ja WS-is toatemperatuuril
- Pange valmis soojendamisnõud (nagu on näidatud HSV seadme joonisel).
 - Temperatuuril 37 °C: jaotage aseptika reegleid järgides 250 µl TS-i steriilsesse 4-kambriisse nõusse või organkultuuri tassile ja asetage ilma CO₂ või kuumutusfaasita 37 °C inkubaatorisse vähemalt 30 minutiks enne soojendamisprotseduuri.
 - MÄRKUS. Ootsüütide puhul kasutage vähemalt 1 ml TS-i.
 - Määrake LN₂ külmikus sulatatavad HSV-kõrred ja viige need sulatamisprotseduuri eel kiirelt üle LN₂ nõusse.
 - Asetage LN₂ nõu kiireks tegutsemiseks mikroskoobi lähedusse.
 - Tõstke TS-i tass 37 °C inkubaatorist või soojendusaluselt ära ning asetage see mikroskoobilasele.
 - Tõstke kõrt naipjal, et paljastuks värviline käsitsemisvarras. Jälgige, et proovi (proove) sisaldav ots jääks LN₂ sisse.
 - Lõigake Knipexi (või muu traadilõikeseadme) abil kõrs värvilise käsitsemisvarda juurest läbi. Knipexi punane lõikepikkuse juhik peab olema kas maksimumpikkuses või ära võetud.
 - Teine võimalus on sõrmede ja pöidla abil kõrt keerata ning teha samal ajal kääridega lõikamisiigutusi 10 mm värvilise käsitsemisvarda all.
 - Haarake ühe kiire, aga kontrollitud liigutusega käsitsemisvardast kinni ja tõmmake see kõrrest välja.
 - Kastke soon kohe 37 °C TS-i sisse ja keerutage õrnalt, et proovid seadme külgjest eraldada; jätke 1 minutiks seisma.
- Sammud 9–12 tuleb teha toatemperatuuril (22–27 °C).
- Toatemperatuuril: kandke aseptilist tehnikat kasutades üks (1) 50 µl DS-i tilk steriilsele Petri tassile.
- Tõmmake veidi DS-i ülekandepipetti ja viige proov(id) TS-i tilgast koos minimaalse lisamahuga 4 minutiks DS-i tilga sisse.
- MÄRKUS. Proov püsib DS-is olles kokku tõmbunud.
- SELLEL AJAL PANGE VALMIS KAKS 50 µl WS-i TILKA (WS1, WS2), NAGU ON NÄIDATUD HSV-SEADME JOONISEL.
- Viige proov(id) 4 minutiks WS-i tilga (WS1) sisse.
- MÄRKUS. Proovid peaksid 2–3 minutiga WS-is olles algsuurusesse tagasi paisuma.
- Seejärel viige proov(id) 4 minutiks teise WS-i tilga (WS2) sisse.
- Viige soojendatud OOTSÜÜDID üle varem tasakaalustatud söötmesse koos 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valgulisandiga (2–3 tunniks, et rakustruktuur jõuaks taastuda), enne kui alustatakse edasist käsitsemist.
- Soojendatud EMBÜO(TE) puhul on variante kaks:
- kohekses patsiendile siirdamiseks viige EMBRÜO(D) varem tasakaalustatud ülekandainesse, mis sisaldab 20% (mahuprotsenti) või 12 ml/ml valgulisandit;
 - edasiseks kultuurimiseks: viige EMBRÜO(D) 4-tunniseks taastumisperioodiks varem tasakaalustatud söötmale, mis sisaldab 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valgulisandit. Pärast taastumisperioodi viige EMBRÜO(D) söötmele koos 10% (mahuprotsenti) valguga ja inkubeerige kuni patsiendile siirdamiseks soovitud arengufaasi saavutamiseni.
- MÄRKUS. Taastatud ootsüüdid tuleb pärast vitrifitseerimist viljastada optimaalse viljastumise tagamiseks ICSI abil.

CRYOLOCK™-I KUI KANDJA SOOJENDAMINE

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Steriilne 4 süvendiga tass või steriilsed väikesed Petri tassid (35 × 10 mm või samaväärsed)
- Ühekorrakindad
- Ülekandepipetid
- Stopper või taimer
- Vedela lämmastiku nõu
- Vedel lämmastik
- Sööde koos valguga, eeltasakaalustatud enne sulatamisprotseduuri temperatuurile 37 °C CO₂-inkubaatoris
- 37 °C inkubaator ilma CO₂ või kuumutusfaasita
- Tangid

KASUTUSJUHE

Vit Kit-Thaw™ komponendid (kasutuskorra kohta)

- 1 ml Thawing Solution-TS-i
- 50 µl Dilution Solution-DS-i
- 100 µl Washing Solution-WS-i

SOOJENDUSPROTOKOLL

MÄRKUS. Soojendusetaapid hõlmavad vahendi kastmist 37 °C TS-i sisse ning edasist lahjendamist ja loputamist DS-is ja WS-is toatemperatuuril

- Pange valmis sulatusnõu (nagu on näidatud Cryolocki skeemil, joonis 1).
 - Temperatuuril 37 °C: jaotage aseptilist tehnikat kasutades 1 ml TS-i ja soojendage ilma CO₂-ta inkubaatoris temperatuurile 37 °C või hoidke vähemalt 30 minutit enne soojendusprotseduuri alustamist soojendusalusel.
 - Määrake soojendatavad Cryolocki proov(id) ja kandke need kiirelt LN₂ säilituskohast üle LN₂-ga täidetud hoiunõusse, et neid soojendamiseks ette valmistada.
 - Asetage LN₂-ga täidetud hoiunõu tööpinna ja mikroskoobilase vahetusse lähedusse, et proove saaks kiirelt nõust TS-i sisse tõsta.
 - Tõstke TS-i tass 37 °C inkubaatorist või soojendusaluselt ära ning asetage see mikroskoobilasele.
 - Hoidke Cryolocki korpuse ülemist otsa tangidega nii, et tuvastussilt oleks üleväl.
 - Variant A: eemaldage kiirelt, aga õrnalt LN₂ all olev kork, keerates osi kuni vabanemiseni.
 - Variant B: võtke Cryolock kiirelt LN₂ seest välja ja eemaldage õrnalt keerates kiiresti kork.
- MÄRKUS. Labor peab oma protseduurid ja protokollid kooskõlastama. Varianti A ei ole lubatud kasutada USA-s.
- Sukeldage Cryolock, nõgus ots koos proovi(de)ga ülevälpool, 37°C TS-i sisse. Liigutage Cryolocki mikroskoobiga jälgides õrnalt, kuni proov(id) otsaku küljest lahti tulevad.
 - Jätke proov(id) 1 minutiks TS-i sisse.

8. Kolmkümmend (30) sekundit pärast sissekastmist tõmmake proov(id) õrnalt pipeti sisse, kui need pinnale tõusevad, ja viige TS-i põhja. Sammud 9–12 tuleb teha toatemperatuuril (22–27 °C).

- Toatemperatuuril: Kandke aseptilist tehnikat kasutades üks (1) 50 µl DS-i tilk Petri tassi tagurpidi kaanele (vt Cryolocki skeem, joonis 2).

9. Viige proov(id) 4 minutiks DS-i sisse. Pipettige proove õrnalt üks kord, et tagada nende täielik DS-iga loputamine.

MÄRKUS. Proov püsib DS-is olles kokku tõmbunud.

10. 4-minutilise DS-is olemise ajal kandke aseptilist tehnikat kasutades kaane peale kaks (2) 50 µl tilka WS-i (WS1, WS2), nagu joonisel näidatud.

11. Viige proov(id) WS1 ja siis WS2 sisse, mõlemasse 4 minutiks, ning ärge neid liigutage.

MÄRKUS. Proovid peaksid 2–3 minutiga WS-is olles algsuurusesse tagasi paisuma.

12. Viige soojendatud OOTSÜÜDID üle varem tasakaalustatud söötmesse koos 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valgulisandiga (2–3 tunniks, et rakustruktuur jõuaks taastuda), enne kui alustatakse edasist käsitsemist.

Soojendatud EMBÜO(TE) puhul on variante kaks:

- a) koheseks patsiendile siirdamiseks viige EMBRÜO(D) varem tasakaalustatud ülekandainesse, mis sisaldab 20% (mahuprotsenti) või 12 ml/ml valgulisandit;
- b) edasiseks kultuurimiseks: viige EMBRÜO(D) 4-tunniseks taastumisperioodiks varem tasakaalustatud söötmele, mis sisaldab 20% (mahuprotsenti) või 12 mg/ml valgulisandit. Pärast taastumisperioodi viige EMBRÜO(D) söötmele koos 10% (mahuprotsenti) valguga ja inkubeerige kuni patsiendile siirdamiseks soovitud arengufaasi saavutamiseni.

Lisateabe saamiseks nende toodete kasutamise kohta peavad laborid tutvuma oma protseduuride ja protokollidega, mis on välja töötatud ja optimeeritud spetsiaalselt nende individuaalse meditsiiniprogrammi jaoks.

SÄILITUSJUHISED JA STABIILSUS

Säilitage avamata viaale külmkapis temperatuuril 2–8 °C. Juhistekohasel säilitamisel on Vitrification Thaw Kiti lahused stabiilsed kuni viaali etiketidel näidatud aegumiskuupäevani.

Ärge kasutage söödet üle kaheksa (8) nädala pärast anumate avamist.

Kuna tootes sisaldub inimpärilolu materjali, võivad selles tekkida säilitamisel osakesed. Need osakesed ei põhjusta teadaolevalt toote jõudluse muutusi.

ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED

See seade on mõeldud kasutamiseks personalile, kes on saanud väljaõppe abistatud viljastamisprotseduuride alal. Need protseduurid hõlmavad seadme sihtotstarbelist kasutamist.

Vahendit kasutav asutus vastutab toote jälgitavuse eest ja peab vajaduse korral järgima jälgitavust puudutavaid riiklikke eeskirju.

Ärge kasutage lahuseviaali, milles on märgata kahjustusi, lekkkeid, osakesi, hägusust või värvimuutusi. Kõrvaldage toode kooskõlas siseriikliku seadusandlusega.

Saastumise vältimiseks kasutage vahendeid aseptilist tehnikat kasutades.

Praegusel ajal näitab erialane kirjandus, et vitrifitseerimise pikaajalise mõjud ootsüütidele ja embrüotele on teadmata.

Ärge kasutage ühtegi pudelit, mille steriilne pakend on kahjustunud.

EL: inimverest või -plasmast valmistatud ravimite manustamisega kaasneva infektsiooniohu vältimiseks kasutatakse standardmeetmetena mh doonorite valimist, individuaalse doonorvere ja kokkusegatud plasma skriinimist spetsiifiliste infektsioonimarkerite suhtes ning selliste tootmisprotsesside rakendamist, mis inaktiveeriksid või hävitaksid tõhusalt viiruseid. Hoolimata sellest ei saa inimverest või -plasmast valmistatud ravimite manustamisel täielikult välistada infektsioonikandjate ülekandumist. See kehtib ka senitundmatute või uute viiruste ja teiste patogeenide kohta. Puuduvad tõendid viiruse ülekandumise kohta Euroopa Farmakopöa spetsifikatsioonidele vastava tootmisprotsessiga saadud albumiini vahendusel. Selleks et hoida seost patsiendi ja tootepartii vahel, on tungivalt soovitatav, et iga kord, kui patsiendile manustatakse ettevõttes Irvine Scientific, LLC toodetud reproduktiivset söödet, märgitakse üles toote nimetus ja partii number.

USA: toode sisaldab inimese seerumi albumiini (HSA). Selle preparaadi tootmisel kasutatud inimpärilolu lähtematerjali on testitud USA Toidu- ja Raviameti (FDA) litsentsitud katsekomplektidega ning on leitud, et need on C-hepatiidi (HCV) antikehade ja inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) antikehade suhtes mittereaktiivsed. Siiski ei taga ükski testimismeetod täielikult, et inimpärilolu tooted on infektsioonivabad. Käideldge kõiki inimpärilolu lähtematerjale nakkust edastada võiva materjalina ja rakendage üldisi ettevaatusabinõusid. Algmaterjali doonoreid on skriinitud ka CJD suhtes.

VASTUNÄIDUSTUS

Toode sisaldab gentamüülsulfaati. Tuleb rakendada sobivad ettevaatusabinõusid veendumaks, et patsient ei ole selle antibiootikumi suhtes ülitundlik.

EU-FIGYELMEZTETÉS: Kizárólag professzionális felhasználásra.

FELHASZNÁLÁSI JAVALLATOK

A Vit Kit-Thaw (vitifikációs olvasztási készlet) rendeltetése az Irvine Scientific Vitricification Freeze Kit alkalmazásával vitrifikált petesejtek (MI), pronukleáris (PN) zigóták, 3 napos osztódási állapotú embriók és blasztociszta állapotú embriók felolvasztása. (Katalógusszám: 90133-SO)

TERMÉKISMERTETÉS

A Thawing Solution-TS a Medium-199-nek egy HEPES-sel pufferelt oldata, amely gentamicin-szulfátot, 1,0 M szacharózt, valamint 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS) készítményt tartalmaz.

A Dilution Solution-DS a Medium-199-nek egy HEPES-sel pufferelt oldata, amely gentamicin-szulfátot, 0,5 M szacharózt, valamint 20% (v/v) DSS-t tartalmaz.

A Washing Solution-WS a Medium-199-nek egy HEPES-sel pufferelt oldata, amely gentamicin-szulfátot, valamint 20% (v/v) DSS-t tartalmaz.

A DSS egy fehérjekiegészítő készítmény, amely 50 mg/ml gyógyászati minőségű humán szérumalbuminból (HSA) és 20 mg/ml dextránból áll. A Vit Kit-Thaw oldat 20% (v/v) DSS-t tartalmaz, amely HSA esetében 10 mg/ml, dextrán esetében pedig 4 mg/ml végső koncentrációt jelent.

Ezt a három oldatot egymás után kell alkalmazni a lépésenkénti mikrocsepp-felmelegítési protokollnak megfelelően.

ÖSSZETÉTEL

<u>Sók és ionok</u>	Nikotinsav-amid	<u>Fehérjeforrások</u>	Prolin	<u>Egyéb</u>
Nátrium-klorid	Pantoténsav	Humán szérumalbumin	Tirozin	Guanin
Nátrium-foszfát	Riboflavin	<u>Pufferek</u>	Alanin	Hipoxantin
Kálium-klorid	Piridoxin	Nátrium-bikarbonát	Aszparaginsav	Timin
Magnézium-szulfát	Tiamin	HEPES	Glutaminsav	Uracil
Nátrium-acetát	Biotin	<u>pH-indikátor</u>	Izoleucin	Xantin
Kalcium-klorid	Alfa-tokoferol	Fenolvörös	Leucin	Adenozin
Vas-nitrát	Nátrium-biszulfid	<u>Makromolekulák</u>	Metionin	Adenin-szulfát
Kolin-klorid	<u>Antioxidáns</u>	Szacharóz	Fenilalanin	Dezoxiribóz
<u>Vitaminok és ásványi anyagok</u>	Glutation	Dextrán	Szerin	Ribóz
Aszkorbinsav	<u>Antibiotikum</u>	<u>Aminosavak</u>	Treonin	<u>Víz</u>
Aminobenzoinsav	Gentamicin-szulfát	Arginin	Triptofán	Injekcióhoz való minőségű víz
Kalciferol	<u>Energiaszubsztrátok</u>	Glicin	Valin	
Folsav	Glükóz	Hisztidin	Cisztein	
Nikotinsav	Inozitol	Lizin	Hidroxiprolin	
			Cisztin	

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

A Vit Kit-Thaw oldatai membránszűrővel és aseptikus technikával készültek, validált gyártási eljárások szerint.

A Vit Kit-Thaw minden egyes tételére elvégzik a következő tesztek:

Oldatok:

- Endotoxin limulus amóbobocita lizátum (LAL) módszerrel ($\leq 0,6$ EU/ml);
- Egér-embrió-assay (egysejtes) ($\geq 80\%$ kiterjesztett blasztociszta);
- Sterilitás a jelenlegi Amerikai Gyógyszerkönyv <71> (Sikeres) sterilitási vizsgálatával.

Minden eredményről jelentés készül egy tételspecifikus analitikai bizonylaton, amely kérésre hozzáférhető.

A CRYOTIPNEK MINT HORDOZÓNAK A MELEGÍTÉSÉHEZ:

SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ANYAGOK

- Csatlakozó (katalógusszám: 40736) vagy adapter
- Steril Petri-csészék (50 × 9 mm-es, Falcon 351006 vagy azzal egyenértékű)
- Eldobható kesztyűk
- Hamilton GASTIGHT® fecskendő (50 µl, katalógusszám: 80901)
- Transzfertpipetták (hűtött üvegpipetták vagy mikropipettahegyek, ~200 µm-es belső hegyátmérővel)
- Csipesz
- Stopperóra vagy időzítő
- Folyékony nitrogén tartály (dewar vagy polisztirolhab-tartály fedéllel, 1-2 l-es térfogat)
- Folyékony nitrogén (elegendő mennyiség a tartályban a 4 hüvelykes (10 cm) mélység eléréséhez)
- Éles olló (steril)
- 37 °C-os vízfürdő
- Tenyésztőmedium fehérjével, CO₂ inkubátorban előzetesen 37 °C-ra kiegyenlítő a felolvasztási eljárás előtt
- 37 °C-os, CO₂ nélküli inkubátor vagy melegítőhely

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A Vit Kit-Thaw összetevői (alkalmazásonként):

- 50 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS
- 1 csatlakozó

FELMELEGÍTÉSI PROTOKOLL

(PETESEJTEK ÉS EMBRIÓK ESETÉBEN):

- MEGJEGYZÉS: Az eljárásokat szobahőmérsékleten (20–27 °C) kell elvégezni. NE HASZNÁLJON melegített mikroszkóptárgyasztalt a következő eljárásokhoz.
- VIGYÁZAT! A felolvasztási adatokban végzett műveletek során minimalizálja a minta fénynek való kitettségét.
1. A TS, a DS és a WS felhasználandó mennyiségének hőmérsékletét állítsa szoba-hőmérsékletűre (20–27 °C) a lefagyasztott minták felmelegítése előtt.
MEGJEGYZÉS: Ne melegítse fel ismételten szoba-hőmérsékletűre a teljes TS-, DS- és WS-fiólát, ha minden alkalommal csak egy kis része szükséges az oldatnak. Javasoljuk, hogy mérje ki a felhasználandó mennyiséget, és a kimérés után azonnal tegye vissza a fiókat 2–8 °C-ra.
 2. Töltse fel a folyékony nitrogénes tartályt folyékony nitrogénnel (~ 80%-ig tele), és helyezze a felengedni kívánt mintákat tartalmazó a folyékony nitrogénes fagyasztó közelébe.
 3. Vegye ki a folyékony nitrogénes tárolóból a kriocstartórt a kelyhekkel, amelyek a CryoTipeket tartalmazzák a virtifikált mintákkal, és tegye át azokat a folyékony nitrogénnel töltött tartályba.
VIGYÁZAT! Győződjön meg arról, hogy a CryoTipek alémerülve maradnak a cseppfolyós nitrogénben (a kehelyben), mialatt átvízi a folyékony nitrogénnel töltött tartályba, hogy megelőzze a minták ellenőrizetlen felengedését.
Helyezze a tartályt a mikroszkóphoz közel a gyors manipuláció érdekében.
 4. Címkezza fel a steril Petri-csészét (vagy fedelet) a szükséges információkkal.
 5. Óvatosan fordítsa le-fel kétszer az egyes TS-, DS- és WS-fiólát a tartalmuk használat előtti összekeveréséhez.
 6. Készítse elő az oldatcseppeket tartalmazó csészéket a felmelegítési eljáráshoz az alábbiak szerint:
Aszeptikusan adagoljon egy 2 mikrocseppből álló cseppsorozatot a steril Petri-csésze megfordított fedelére az 1. ábrán látható módon, majd helyezze a csészét a mikroszkóp tárgyasztalára:
 - egy 50 µl-es csepp a TS-ből
 - egy 50 µl-es csepp a DS-ből
 - (A WS két cseppjének előkészítésére később, a 11. lépésben kerül sor.)
 7. Helyezze a 37 °C-os vízfürdőt a mikroszkóp közelébe. Legyenek a közelben a következők: egy transzferpipetta és hegyek, steril éles olló, Hamilton-fecskendő és steril törlőkendő.
 8. Csipesz (vagy fogót) használva vegye ki a kívánt CryoTipet a kriocstartóból a cseppfolyós nitrogénben, gyorsan merítse a CryoTipet 37 °C-os vízfürdőbe (≥ 500 ml térfogatú vízbe), és keverje óvatosan 3 másodpercig, hogy felengedjen (lásd 2. ábra) 24 000 °C/perc sebességgel.
 9. Gyorsan ossza szét a CryoTip tartalmát a következőképpen (lásd 3. ábra):
 - Gyorsan törölje szárazra a CryoTipet egy steril törlővel.
 - Távolítsa el a fém záróhengert.
 - Vágja le a légmentes zárat a CryoTip széles végénél, a 4. jelnél.
 - Csatlakoztassa szorosan a CryoTip széles végét egy Hamilton-fecskendőre vagy más megfelelő felszívóeszköze egy csatlakozó vagy adapter segítségével.MEGJEGYZÉS: Húzza fel a fecskendő dugattyúját körülbelül 0,5 hüvelykre (1,3 cm) mielőtt a fecskendőt az összekötőcsőhöz és a CryoTiphez csatlakoztatja.
 - Óvatosan törölje szárazra a vékony hegyet egy steril törlőkendővel.
 - A CryoTipet az előkészített felengedő edény fölött elhelyezve gyorsan vágja fel a zárat a vékony csúcsvég 2. jelénél, és juttassa a CryoTip tartalmát egy kis cseppként (~1 µl) az edény száraz részére, a TS-csepp fölé (lásd 4. ábra).MEGJEGYZÉS: KERÜLJE A BUBORÉKOKAT AZ ADAGOLÁS SORÁN.
 10. Olvassa össze a TS cseppet a CryoTip tartalmával, és hagyja, hogy fokozatosan összekeveredjenek 1 percig (lásd 4. ábra).
Megjegyzés: a minták összezsugorodnak és felúsznak a csepp tetejére.
MEGJEGYZÉS: A minta/minták átvitelekor minden esetben fújjon ki minden maradék folyadékot a transzferpipettából, és szívjon fel valamennyi oldatot a következő cseppből a következő művelet előtt. Kerülje a buborékképződést az átvitelek során.
 11. Szívjon fel valamennyi DS-t a transzferpipettába, és vigye át a mintát/mintákat a TS cseppből minimális térfogattal a DS-cseppbe 4 percre.
MEGJEGYZÉS: A minta összezsugorodva fog maradni a DS-expozíció során.
EZ ALATT AZ IDŐ ALATT VIGYEN FEL KÉT 50 µl-ES CSEPP WS-t (WS1, WS2) A 4. ÁBRÁN LÁTHATÓ MÓDON.
 12. Vigye át a mintá(ka)t a WS-cseppbe (WS1) 4 percre.
MEGJEGYZÉS: A mintának (mintáknak) 2-3 percen belül vissza kell nyernie (nyerniük) az eredeti méretét (méretüket) a WS-ben.
 13. Ezután vigye át a mintá(ka)t a második WS-cseppbe (WS2) 4 percre.
 14. A felmelegített PETESEJTE(K)E)t a laboratóriumi protokoll szerint előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített tenyésztőműdiumba kell helyezni a visszanyeréshez (2-3 órára, hogy legyen elég idő az orsó újraképződésére) a későbbi műveletek előtt.
A felmelegített EMBRIÓ(K) esetén két lehetőség áll rendelkezésre:
 - a) A páciens testébe történő azonnali átvitelhez: helyezze az EMBRIÓ(KA)T az előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített „transzferműdiumba”.
 - b) További tenyésztéshez: helyezze az EMBRIÓ(KA)T előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített tenyésztőműdiumba egy 4 órás visszanyerési periódusra. A visszanyerési periódust követően helyezze az EMBRIÓ(KA)T 10% (v/v) fehérjét tartalmazó tenyésztőműdiumba, és inkubálja mindaddig, amíg el nem éri a páciens testébe történő átvitelhez kívánt fejlődési stádiumot.
- A HSV-ESZKÖZNEK MINT HORDOZÓNAK A MELEGÍTÉSÉHEZ:**
- SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ANYAGOK**
- Steril, négylukú csésze (Nunc 179830, 144444 vagy ezzel egyenértékű) vagy szervtenyésztő edény (BD Falcon 353037)
 - Eldobható kesztyűk
 - Transzferpipetták
 - Csipesz
 - Stopperóra vagy időzítő
 - Folyékony nitrogénes tartály
 - Folyékony nitrogén

- Olító, Knipex vagy más húzavágó eszköz
- Tenyésztőmedium fehérjével, CO₂ inkubátorban előzetesen 37 °C-ra kiegyenlítő a felolvasztási eljárás előtt
- 37 °C-os, CO₂ nélküli inkubátor vagy melegítőhely

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A Vit Kit-Thaw összetevői (alkalmazásonként):

- 250 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

FELMELEGÍTÉSI PROTOKOLL

(PETESEJTEK ÉS EMBRIÓK ESETÉBEN):

MEGJEGYZÉS: A felmelegítési lépések része a minta 37 °C-os TS-be merítése, és az azt követő DS-ben és WS-ben történő hígítás és mosás szobahőmérsékleten.

1. Készítse elő a felmelegítőedényeket (a HSV-eszköz ábráján látható módon):
 - 37 °C-on: Adagoljon aseptikusan 250 µl TS-t egy steril, négylyukú csészébe vagy szervtenyésztő edénybe, és helyezze 37 °C-os, CO₂ nélküli inkubátorba vagy melegítőhelyre, legalább 30 perccel a felmelegítési eljárás előtt.
2. MEGJEGYZÉS: Petesejtek esetében adagoljon legalább 1 ml TS-t.
3. Azonosítsa a felmelegíteni kívánt HSV műszalmá(ka)t a folyékony nitrogén tárolóban, és gyorsan tegye át a folyékony nitrogénnel töltött tartályba a felengedési eljárásához való előkészítéshez.
3. Helyezze a folyékony nitrogén tartályt a mikroszkóphoz közel a gyors manipuláció érdekében.
4. Vegye ki a TS-csészét a 37 °C-os inkubátorból vagy a melegítőhelyről, és helyezze a mikroszkóp tárgyasztalának tetején fókuszba.
4. Húzza ki a műszalmát annyira, hogy a színezett fogantyú láthatóvá váljon. Vigyázzon arra, hogy a mintá(ka)t tartalmazó vége a folyékony nitrogénbe merülve maradjon.
6. Knipex (vagy más húzavágó eszköz) segítségével vágja át a műszalmát a színezett fogantyú magasságában. A Knipexen található piros vágáshosszmutatót a maximális hosszra kell pozicionálni vagy el kell távolítani.
 - A másik lehetőség, ha az ujjával és a hüvelykujjával forgatja a műszalmát, miközben vágó mozdulatokat tesz olóló 10 mm-rel a színezett fogantyú tetejétől.
7. Egyetlen gyors, de fegyelmezett mozdulattal ragadja meg a fogantyút, és húzza ki a műszalmából.
8. Azonnal merítse a mintát tartó véget a 37 °C-os TS-be, óvatosan forgassa, hogy a minta elváljon az eszköztől, és hagyja így 1 percig.

A 9-12. lépést szobahőmérsékleten kell elvégezni (22-27 °C).

- Szobahőmérsékleten: Aseptikusan adagoljon egy (1) 50 µl-es DS-cseppet egy steril Petri-csészébe.
9. Szívjon fel valamennyi DS-t a transzferpipettába, és vigye át a mintá(ka)t a TS cseppből minimális térfogattal a DS-cseppbe 4 percre.

MEGJEGYZÉS: A minta összezsugorodva fog maradni a DS-expozíció során.

EZ ALATT AZ IDŐ ALATT VIGYEN FEL KÉT 50 µl-ES CSEPP WS-t (WS1, WS2) A HSV-ESZKÖZ ÁBRÁJÁN LÁTHATÓ MÓDON.

10. Vigye át a mintá(ka)t a WS-cseppbe (WS1) 4 percre.
10. MEGJEGYZÉS: A mintának (mintáknak) 2-3 percen belül vissza kell nyernie (nyerniük) az eredeti méretét (méretüket) a WS-ben.
11. Ezután vigye át a mintá(ka)t a második WS-cseppbe (WS2) 4 percre.
12. A felmelegített PETESEJTE(KE)T a laboratóriumi protokoll szerint előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített tenyésztőmediumba kell helyezni a visszanyeréshez (2-3 órára, hogy legyen elég idő az orsó újraképződésére) a későbbi műveletek előtt.

A felmelegített EMBRIÓ(K) esetén két lehetőség áll rendelkezésre:

- a) A páciens testébe történő azonnali átvitelhez: helyezze az EMBRIÓ(KA)T az előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített „transzfermediumba”.
- b) További tenyésztéshez: helyezze az EMBRIÓ(KA)T előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített tenyésztőmediumba egy 4 órás visszanyerési periódusra. A visszanyerési periódust követően helyezze az EMBRIÓ(KA)T 10% (v/v) fehérjét tartalmazó tenyésztőmediumba, és inkubálja mindaddig, amíg el nem éri a páciens testébe történő átvitelhez kívánt fejlődési stádiumot.

MEGJEGYZÉS: A vitrificáció után visszanyert petesejteket intracitoplazmás spermainjekcióval (ICSI) kell megtermékenyíteni az optimális megtermékenyítés érdekében.

A CRYOLOCK™-NAK MINT HORDOZÓNAK A MELEGÍTÉSÉHEZ:

SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ANYAGOK

- Steril, négylyukú csésze vagy steril, kis Petri-csészék (35 × 10 mm-es vagy azzal egyenértékű)
- Eldobható kesztyűk
- Transzferpipetták
- Stopperóra vagy időzítő
- Folyékony nitrogén tartály
- Folyékony nitrogén
- Tenyésztőmedium fehérjével, CO₂ inkubátorban előzetesen 37 °C-ra kiegyenlítő a felolvasztási eljárás előtt
- 37 °C-os, CO₂ nélküli inkubátor vagy melegítőhely
- Fogó

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A Vit Kit-Thaw – Thaw összetevői (alkalmazásonként):

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS

FELMELEGÍTÉSI PROTOKOLL

MEGJEGYZÉS: A felmelegítési lépések része a minta 37 °C-os TS-be merítése, és az azt követő DS-ben és WS-ben történő hígítás és mosás szobahőmérsékleten.

1. Készítse elő a felolvasztó csészét (a Cryolock ábráján látható módon: 1. ábra):
 - 37 °C-on: Adagoljon aseptikusan legalább 1 ml TS-t, és melegítse 37 °C-ra egy CO₂ nélküli inkubátorban vagy melegítőhelyen legalább 30 percig a felmelegítési eljárás megkezdése előtt.

2. Azonosítsa a felmelegíteni kívánt Cryolock mintákat, és gyorsan tegye át a folyékony nitrogén tartálóból a folyékony nitrogénnel töltött tartályba a felengedési eljárásához való előkészítéshez.
3. Helyezze a folyékony nitrogénnel töltött tartályt a mikroszkóp munkaterületének és tárgyasztalának közvetlen közelébe, a tartályból a TS-be történő későbbi gyors manipuláció biztosítása érdekében.
4. Vegye ki a TS-csészét a 37 °C-os inkubátorból vagy a melegítőhelyről, és helyezze a mikroszkóp tárgyasztalának tetején fókuszba.
5. Csípséssel tartsa meg a Cryolock törzsének felső végét úgy, hogy az azonosítócímké felfelé nézzen.

A. opció: Folyékony nitrogén alatt gyorsan, de óvatosan vegye le a kupakot a részek elcsavarásával a kioldásig.

B. opció: Gyorsan vegye ki a Cryolockot a folyékony nitrogénből, majd egy óvatos csavarással gyorsan vegye le a kupakot.

MEGJEGYZÉS: A laboratóriumoknak a saját laboratóriumi eljárásaikat és protokolljaikat kell figyelembe venniük. Az A. opció használatát az Egyesült Államokban nem jóváhagyott.

6. Azonnal merítse a Cryolock konkáv hegyét a 37 °C-os TS-be a mintával vagy mintákkal felfelé. Mikroszkóp alatt óvatosan mozgassa a Cryolockot, amíg a minta vagy minták el nem válnak a hegytől.
7. A mintá(ka)t összesen 1 percig hagyja a TS-ben.
8. Az első alámerítést követően harminc (30) másodperccel óvatosan pipettázza fel a mintá(ka)t, ha felül úszik/úsznak, és helyezze a TS aljára.

A 9–12. lépést szobahőmérsékleten kell elvégezni (22–27 °C).

- Szobahőmérsékleten: Aszeptikusan adagoljon egy (1) 50 µl-es DS-cseppet egy steril Petri-csészébe (lásd a Cryolock ábráját: 2. ábra).

9. Helyezze át a mintá(ka)t a DS-be 4 percre. Óvatosan pipettázza fel egyszer a mintákat a DS-ben történő teljes leöblítés érdekében.

MEGJEGYZÉS: A minta összezsugorodva fog maradni a DS-expozíció során.

10. A 4 perces DS-expozíció során aszeptikusan adagoljon két (2) 50 µl-es WS-cseppet (WS1, WS2) az ábrán látható módon.

11. Helyezze a mintá(ka)t a WS1-be, majd a WS2-be 4-4 percre zavartalanul.

MEGJEGYZÉS: A mintának (mintáknak) 2-3 percen belül vissza kell nyernie (nyerniük) az eredeti méretét (méretüket) a WS-ben.

12. A fellelített PETEASEJTE(KE)T a laboratóriumi protokoll szerint előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített tenyésztőműdiumba kell helyezni a visszanyeréshez (2-3 órára, hogy legyen elég idő az orsó újraképződésére) a későbbi műveletek előtt.

A fellelített EMBRIÓ(K) esetén két lehetőség áll rendelkezésre:

- a) A páciens testébe történő azonnali átvitelhez: helyezze az EMBRIÓ(KA)T az előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített „transzferműdiumba”.
- b) További tenyésztéshez: helyezze az EMBRIÓ(KA)T előzetesen kiegyenlített, 20% (v/v) vagy 12 mg/l proteinnel kiegészített tenyésztőműdiumba egy 4 órás visszanyerési periódusra. A visszanyerési periódust követően helyezze az EMBRIÓ(KA)T 10% (v/v) fehérjét tartalmazó tenyésztőműdiumba, és inkubálja mindaddig, amíg el nem éri a páciens testébe történő átvételhez kívánt fejlődési stádiumot.

A termékek használatára vonatkozó további részletekért minden laboratóriumnak a saját laboratóriumi eljárásait és protokolljait kell figyelembe vennie, amelyeket specifikusan a saját orvosi programjukhoz hoztak létre és optimalizáltak.

TÁROLÁSI UTASÍTÁSOK ÉS STABILITÁS

A bontatlan fiolákat tárolja hűtve, 2 °C és 8 °C között. A Vitrification Thaw Kit adatok stabilak a fiolák címkéjén feltüntetett lejárati időig, ha tárolásuk az utasításoknak megfelelően történik.

A tartályok kinyitása után ne használja a médiumokat nyolc (8) hétnél tovább.

Mivel a termékben humán eredetű anyag található, ezért a tárolás során részecskék alakulhatnak ki. Nem ismert, hogy ezek a részecskék befolyásolják a termék teljesítményét.

ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

Ezt a terméket az asszisztált reprodukciós eljárásokban képzett személyzet általi felhasználásra szánták. Ezen eljárások közé tartozik az az alkalmazás is, amelyre ezt a terméket szánták.

A terméket használó intézmény felelős a termék nyomon követhetőségének fenntartásáért, és be kell tartania a nyomon követhetőségre vonatkozó országos előírásokat, ha vannak ilyenek.

Ne használjon olyan oldatos fiolát, amely sérült, szivárog, részecskék jelenlétét mutatja, esetleg zavaros, vagy megváltozott a színe. A terméket a vonatkozó előírásoknak megfelelően dobja ki.

A beszenyeződéssel járó problémák elkerülése érdekében aszeptikus technikák alkalmazásával kezelje.

Jelenleg a kutatási szakirodalom szerint a vitrificációnak a petesejtekre és az embriókra gyakorolt hosszú távú hatása ismeretlen.

Ne használjon olyan üveget, amelynek a steril csomagolása megsérült.

EU: A humán vérből vagy plazmából készült gyógyszerkészítmények használatából eredő fertőzések megakadályozására irányuló szokásos intézkedések közé tartozik a donorok kiválasztása, az egyes véradományok és plazmapaolok szűrése a fertőzések specifikus markereire, valamint a vírusok hatástalanítása/eltávolítása érdekében elvégzett hatékony gyártási lépések. Ennek ellenére a humán vérből vagy plazmából készült gyógyszerkészítmények beadásakor nem zárható ki teljesen a fertőző ágensek átadásának lehetősége. Ez érvényes az ismeretlen és újonnan megjelenő vírusokra és más kórokozókra is. Az Európai Gyógyszerkönyv leírása szerinti eljárásokkal gyártott albumin esetében nem jelentettek bizonyított vírusfertőzést. Minden emberi eredetű anyagot úgy kell kezelni, mintha fertőzőképes lenne, ezért meg kell tenni az általános övintézkedéseket. A donorokat Creutzfeldt-Jakob-kór (CJD) is szűrtek.

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK: Ez a termék humán szérumalbumint (HSA) tartalmaz. A termék előállításánál során használt emberi eredetű anyag az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhivatala által hitelesített készülékekkel vizsgálva nem adott reakciót a hepatitis C (HCV) és a humán immundeficiencia vírus (HIV) elleni antitestekkel. Azonban egyetlen vizsgálati módszer sem garantálja azt teljes bizonyossággal, hogy az emberi eredetű készítmények nem fertőzőek. Minden emberi eredetű anyagot úgy kell kezelni, mintha fertőzőképes lenne, ezért meg kell tenni az általános övintézkedéseket. A donorokat Creutzfeldt-Jakob-kór (CJD) is szűrtek.

ELLENJAVALLAT

A termék gentamicin-szulfátot tartalmaz. Megfelelő elővigyázatossági intézkedéseket kell tenni, hogy megbizonyosodjon, a beteg nem szenzitizált erre az antibiotikumra.

ES PERSPĖJIMAS. Skirta naudoti tik specialistams.

NAUDOJIMO INDIKACIJA

„Vit Kit-Thaw“ (vitifikacijos atšildymo rinkinys) yra skirtas vitrifikuotiems oocitams (MI), zigotų su probranduoliais (PN) 3 dienos skilimo stadijos embrionams ir blastocistos stadijos embrionams, kurie buvo vitrifikuoti naudojant „Vitrification Freeze Kit“ (katalogo nr. 90133-SO), atšildyti

ITAISO APRAŠYMAS

Thawing Solution-TS yra HEPES junginiu buferintas terpės 199 tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato, 1,0 M sacharozės ir 20 % (v/v) dekstrano serumo priedo (DSS).

Dilution Solution-DS yra HEPES junginiu buferintas terpės 199 tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato, 0,5 M sacharozės ir 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS yra HEPES junginiu buferintas terpės 199 tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato ir 20 % (v/v) DSS.

DSS yra baltyminis papildas, kurį sudaro 50 mg/ml terapinės paskirties žmogaus serumo albumino (ŽSA) ir 20 mg/ml dekstrano. „Vit Kit-Thaw“ DSS yra naudojamas 20 % (v/v) koncentracijos, kad būtų gauta galutinė 10 mg/ml ŽSA ir 4 mg/ml dekstrano koncentracija.

Šie trys tirpalai bus naudojami sekoje pagal nuoseklų mikrolašų pašildymo protokolą.

SUDĖTIS

<u>Druskos ir jonai</u>	Nikotino rūgšties amidas	<u>Baltymų šaltinis</u>	Lizinas	Hidroksiprolinas
Natrio chloridas	Pantotėninė rūgštis	Žmogaus serumo	Prolinas	Cistinas
Natrio fosfatas	Riboflavinai	albuminas	Tirozinas	<u>Kita</u>
Kalio chloridas	Piridoksinas	<u>Buferiai</u>	Alaninas	Guaninas
Magnio sulfatas	Tiaminas	Natrio bikarbonatas	Asparto rūgštis	Hipoksantinas
Natrio acetatas	Biotinas	HEPES	Glutamo rūgštis	Timinas
Kalcio chloridas	Alfa tokoferolis	<u>pH indikatorius</u>	Izoleucinas	Uracilas
Geležies nitratas	Natrio bisulfatas	Fenolio raudonas	Leucinas	Ksantinas
Cholino chloridas	<u>Antioksidantai</u>	<u>Makromolekulės</u>	Metioninas	Adenozinas
<u>Vitaminai ir mineralai</u>	Glutacionas	Sacharozė	Fenilalaninas	Adenino sulfatas
Askorbo rūgštis	<u>Antibiotikas</u>	Dekstranas	Serinas	Deoksiribozė
Aminobenzoinė rūgštis	Gentamicino sulfatas	<u>Aminorūgštys</u>	Treoninas	Ribozė
Kalciferolis	<u>Energetiniai substratai</u>	Argininas	Triptofanas	<u>Vanduo</u>
Folio rūgštis	Gliukozė	Glicinas	Valinas	Injekcinio vandens
Nikotino rūgštis	Inozolis	Histidinas	Cisteinas	kokybė

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

„Vit Kit-Thaw“ tirpalai yra filtruoti naudojant membraninį filtrą ir apdoroti steriliomis sąlygomis pagal patvirtintus gamybos procesus.

„Vit Kit-Thaw“ kiekvienai partijai atliekami šie testai:

Tirpalai:

endotoksinų kiekio nustatymas pagal kardauodegio krabo amebocitų lizato (LAL) analizės metodą ($\leq 0,6$ EU/ml);

pelės embriono tyrimas (vienos ląstelės) (≥ 80 % padidėjusi blastocista);

sterilumo pagal šiuo metu patvirtintą Jungtinių Valstijų farmakopėjos sterilumo testą <71> (atitinka reikalavimus).

Visi rezultatai pateikiami pagal atskirų partijų parametrus parengtuose analizės sertifikatuose, kuriuos galima gauti užsakius.

„CRYOTIP“ KAIP LAIKYMO ĮTAISUI ATŠILDYTI:

REIKALINGOS, BET NEPAITEIKIAMOS PRIEMONĖS

- Jungtis (katalogo nr. 40736) arba adapteris
- Sterilios petri lėkštelės (50 X 9 mm, „Falcon 351006“ arba analogiškos)
- Vienkartinės pirštinės
- Hamiltono GASTIGHT® švirkštas (50 μ l) katalogo nr. 80901
- Perkėlimo pipetės (stiklo pipetės arba mikropipetėčių antgaliai, kurių vidinis skersmuo ~200 μ m)
- Pincetas
- Chronometras arba laikmatis
- Skystojo azoto indas (diuaro arba polistirolo talpyklė su dangteliu, 1–2 l tūris)
- Skystasis azotas (pakankamas tūris 4 colių (10 cm) gyliui pasiekti talpyklėje)
- Aštrios žirkklės (sterilios)
- 37 °C vandens vonelė
- Pasėlio terpė su baltymais, sušildyta iki 37 °C CO₂ inkubatoriuje prieš atitirpinimo procedūrą
- 37 °C inkubatorius be CO₂ ar šildymo stalo

NAUDOJIMO NURODYMAI

„Vit Kit-Thaw“ komponentai (vienam naudojimui):

- 50 μ l atitirpinimo tirpalo – TS
- 50 μ l skiedimo tirpalo – DS
- 100 μ l plovimo tirpalo – WS
- 1 jungtis

ŠILDYMO PROTOKOLAS

(OOCTABAS IR EMBRIONAMS)

- PASTABA. Procedūras reikia atlikti kambario temperatūroje (20–27 °C). Šioms procedūroms NENAUDOKITE šildomo mikroskopo stalo.
- PERSPĖJIMAS. Manipuliuojant atitirpinimo tirpaluose minimaliai sumažinkite šviesos poveikį bandiniui.
1. Naudojamą TS, DS ir WS kiekį sušildykite iki kambario temperatūros (20–27 °C), prieš šildydami vitrifikuotus bandinius.
 2. PASTABA. Stenkitės pakartotinai nesusildyti visų TS, DS ir WS flakonų iki kambario temperatūros, kai kaskart reikia tik mažo kiekio tirpalo. Geriau paimti naudojamą kiekį ir po paėmimo iškart grąžinti flakonų į 2–8 °C temperatūrą.
 3. Pripildykite skystojo azoto talpyklę skystuoju azotu (~80 % talpyklės) ir padėkite arti LN₂ šaldiklio, kuriame yra norimi atitirpinti bandiniai.
 4. Išimkite laikiklius su taurėmis, kuriose yra „CryoTips“ su vitrifikuotais bandiniais, iš skystojo azoto saugyklos ir perkeltkite juos į skystojo azoto pripildytą talpyklę.
 5. PERSPĖJIMAS. Perkeldami iš saugyklos į LN₂ talpyklę užtikrinkite, kad „CryoTips“ liktų panardinti LN₂ (taurėje), jog bandiniai nekontroliuojamas neatitirptų.
 6. Padėkite talpyklę arti mikroskopo, kad galėtumėte greitai manipuliuoti.
 7. Pažymėkite ant kiekvieno sterilios petri lėkštelės (ar dangtelio) reikalingą informaciją.
 8. Prieš naudodami švelniai du kartus pavartykite kiekvieną TS, DS ir WS flakoną, kad sumaišytumėte jų turinį.
 9. Lėkštelę su tirpalu lašeliais šildymo protokolui paruoškite taip:
Steriliai užlašinkite 2 mikrolašus ant apversto sterilios petri lėkštelės dangtelio, kaip parodyta 1 pav., ir padėkite lėkštelę ant mikroskopo stalo:
 - vienas 50 µl lašas TS
 - vienas 50 µl lašas DS
 - (du WS lašai bus užlašinti vėliau 11 veiksmo metu)
 10. Padėkite 37 °C vandens vonelę arti mikroskopo. Netoli turėkite: perkėlimo pipetę ir antgalius, sterilias aštrias žirkles, Hamiltono švirkštą ir sterilias servetėles.
 11. Žnyplėmis paimkite konkretų „CryoTip“ iš laikiklio, esančio skystajame azote, greitai panardinkite „CryoTip“ į 37 °C vandens vonelę (≥ 500 ml) ir švelniai pamaišykite 3 sekundes, kad sušildytumėte (žr. 2 pav.) + 24 000 °C/min. greičiu.
 12. Greitai paimkite „CryoTip“ turinį, atlikdami šiuos veiksmus (žr. 3 pav.).
 - Greitai sterilia servetėle sausai nušluostykite „CryoTip“.
 - Nuimkite metalinę dengiančiąją movą.
 - Nukirpkite sandariklį, esantį „CryoTip“ plačiame gale ties 4-a žyma.
 - Tvirtai prijunkite „CryoTip“ platųjį galą prie Hamiltono švirkšto arba tinkamos siurbimo priemonės, naudodami jungtį arba adapterį.
 - 13. PASTABA. Prieš prijungdami švirkštą prie jungties ir „CryoTip“, pakelkite švirkšto stūmoklį maždaug 0,5 colio (1,3 cm).
 - 14. Švelniai sterilia servetėle sausai nušluostykite plonąjį galiuką.
 - 15. „CryoTip“ laikydami virš paruošto atitirpinimo indo, greitai nukirpkite sandariklį ties 2-ąja plonojo galiuko žyma ir „CryoTip“ turinį – mažą lašelį (~ 1 µl) – užlašinkite ant indo sausos srities, virš TS lašo (žr. 4 pav.).
 16. PASTABA. KAI LAŠINATE TURINĮ, VENKITE BURBULIUKŲ.
 17. Sulekite TS lašą su „CryoTip“ turiniu ir palaipsniui maišykite 1 minutę (žr. 4 pav.).
Pastaba: bandiniai susitrauks ir plūduriuos lašo viršuje.
 18. PASTABA. Po kiekvieno bandinio (-ių) perkėlimo, išlašinkite likusį skystį iš perkėlimo pipetės ir įtraukite šiek tiek tirpalo iš kito lašo, prieš atlikdami kitą manipuliaciją. Stenkitės, kad perkėlimo metu nesusidarytų burbuliukų.
 19. Įtraukite šiek tiek DS į perkėlimo pipetę ir perkeltkite bandinio (-ių) minimalų kiekį iš TS lašo 4 minutėms.
 20. PASTABA. Bandinys bus susitraukęs, kai jis bus DS.
 21. ŠIUO METU ĮLAŠINKITE DU 50 µl WS (WS1, WS2) LAŠUS, KAIP PARODYTA 4 PAV.
 22. Perkeltkite bandinį (-ius) į WS (WS1) lašą 4 minutėms.
 23. PASTABA. Bandinys (-iai) turėtų vėl išsiplėsti iki pradinio dydžio pavubęs (-ę) WS 2–3 minutes.
 24. Perkeltkite bandinį (-ius) į antrą WS (WS2) lašą 4 minutėms.
 25. Perkeltkite sušildytą (-us) OOCITĄ (-US) į nusistovėjusią kultūros terpę su 20 % (v/v) baltyminio papildo arba 12 mg/ml regeneracijai (2–3 valandoms, kad vėl susiformuotų kaklelis) prieš tolesnes manipuliacijas.
 26. Pašildytam (-iems) EMBRIONUI (-AMS) yra dvi galimybės:
 - a) Skubiai perkelti į pacientę: perkeltkite EMBRIONĄ (-US) į iš anksto nusistovėjusią perkėlimo terpę, kurioje yra 20 % (v/v) arba 12 mg/ml baltyminio papildo.
 - b) Toliau auginti: perkeltkite EMBRIONĄ (-US) į iš anksto nusistovėjusią auginimo terpę, kurioje yra 20 % (v/v) arba 12 mg/ml baltyminio papildo 4 valandų regeneracijos laikotarpiui. Po regeneracijos laikotarpio perkeltkite EMBRIONĄ (-US) į pasėlio terpę su 10 % (v/v) baltymų ir inkubuokite atitinkamai, kol bus pasiekta atitinkama vystymosi stadija ir bus galima perkelti pacientei.

HSV KAIP LAIKYMO ĮTAISUI ATŠILDYTI:

REIKALINGOS, BET NEPAITEIKIAMOS PRIEMONĖS

- Sterilus 4 šulinėlių indas („Nunc“ 179830, 144444 arba analogiškas) arba organų auginimo indas („BD Falcon“ 353037)
- Vienkartinės pirštinės
- Perkėlimo pipetės
- Pincetas
- Chronometras arba laikmatis
- Skystojo azoto talpyklė
- Skystasis azotas
- Žirkklės, „Knipex“ ar kitas vielos pjovimo įtaisas
- Pasėlio terpė su baltymais, sušildyta iki 37 °C CO₂ inkubatoriuje prieš atitirpinimo procedūrą
- 37 °C inkubatorius be CO₂ ar šildymo stalo

NAUDOJIMO NURODYMAI

„Vit Kit-Thaw“ komponentai (vienam naudojimui)

- 250 µl atitirpinimo tirpalo – TS
- 50 µl skiedimo tirpalo – DS
- 100 µl pjovimo tirpalo – WS

ŠILDYMO PROTOKOLAS

(OOCITAMS IR EMBRIONAMS)

- PASTABA. Šildymo veiksmams apima prietaiso panardinimą į 37 °C TS ir vėlesnį skiedimą ir plovimą DS ir WS kambario temperatūroje.
1. Paruoškite šildymo indus (kaip parodyta HSV priemonių schemoje):
 - 37 °C temperatūroje: steriliai išlašinkite 250 µl TS į sterilų 4 šulinėlių indą arba organų auginimo indą ir įdėkite į 37 °C inkubatorių be CO₂ arba ant šildymo stalo bent 30 minučių prieš šildymo procedūrą.
 - PASTABA. Oocitams išlašinkite mažiausiai 1 ml TS.
 2. Pasirinkite norimą (-us) atšildyti HSW šiaudėlį (-ius) iš LN₂ saugyklos ir greitai perkelti į LN₂ pripildytą talpyklą ruošdamiesi atitirpinimo procedūrai.
 3. Padėkite LN₂ talpyklę arti mikroskopo, kad vėliau galėtumėte greitai manipuliuoti.
 4. Išimkite TS lėkštelę iš 37 °C inkubatoriaus ar šildymo stalo ir padėkite ją sucentruotą ant mikroskopo stalo viršaus.
 5. Pakankamai pakelkite šiaudėlį, kad būtų atviras spalvotas tvarkymo strypelis. Užtikrinkite, kad galas su bandiniu (-iais) liktų panardintas (-i) LN₂.
 6. Naudokite „Knipex“ (arba kitą vielos pjovimo įtaisą) šiaudeliui nukirpti spalvoto tvarkymo strypelio aukštyje. Raudona pjovimo ilgio žyma ant „Knipex“ turėtų būti ties maksimalia ilgio padėtimi arba nuimta.
 - Arba pirštais ir nykščiu sukite šiaudėlį, kai kerpate žirkklėmis, 10 mm nuo spalvoto tvarkymo strypelio viršaus.
 7. Vieną greitai, bet kontroliuojamą judesiu greitai suimkite tvarkymo strypelį ir ištraukite jį iš šiaudelio.
 8. Nedelsdami panardinkite vamzdelį į 37 °C TS ir švelniai pasukiokite, kad bandiniai atsiskirtų nuo prietaiso, tada palikite 1 minutei.
 - 9–12 veiksmus reikia atlikti kambario temperatūroje (22–27 °C).
 - Kambario temperatūroje: steriliai užlašinkite vieną (1) 50 µl DS lašą ant sterilios petri lėkštelės.
 9. Ištraukite šiek tiek DS į perkėlimo pipetę ir perkelti bandinio (-ių) minimalų kiekį iš TS lašo į DS lašą 4 minutėms.
 - PASTABA. Bandinys bus susitraukęs, kai jis bus DS.
 - ŠIUO METU IŠLAŠINKITE DU 50 µl WS (WS1, WS2) LAŠUS, KAIP PARODYTA HSV ĮTAISO SCHEMOJE.
 10. Perkelti bandinį (-ius) į WS (WS1) lašą 4 minutėms.
 - PASTABA. Bandinys (-iai) turėtų vėl išsiplėsti iki pradinio dydžio pabuvers (-ę) WS 2–3 minutes.
 11. Perkelti bandinį (-ius) į antrą WS (WS2) lašą 4 minutėms.
 12. Perkelti sušildytą (-us) OOCITĄ (-US) į nusistovėjusią kultūros terpę su 20 % (v/v) baltyminio papildu arba 12 mg/ml regeneracijai (2–3 valandoms, kad vėl susiformuotų kaklelis) prieš tolesnes manipuliacijas.
- Pašildytam (-iems) EMBRIONUI (-AMS) yra dvi galimybės:
- a) Skubiai perkelti į pacienti: perkelti EMBRIONĄ (-US) į iš anksto nusistovėjusią perkėlimo terpę, kurioje yra 20 % (v/v) arba 12 mg/ml baltyminio papildu.
 - b) Toliau augini: perkelti EMBRIONĄ (-US) į iš anksto nusistovėjusią auginimo terpę, kurioje yra 20 % (v/v) arba 12 mg/ml baltyminio papildu 4 valandų regeneracijos laikotarpiui. Po regeneracijos laikotarpio perkelti EMBRIONĄ (-US) į pasėlio terpę su 10 % (v/v) baltymų ir inkubuokite atitinkamai, kol bus pasiekta atitinkama vystymosi stadija ir bus galima perkelti pacienti.
- PASTABA. Regeneruotus oocitus reikia apvaisinti naudojant ITCI, kad apvaisinimas po vitifikacijos būtų optimalus.

„CRYOLOCK™“ KAIP LAIKYMO ĮTAISUI ATŠILDYTI:

REIKALINGOS, BET NEPAKEIKIAMOS PRIEMONĖS

- Sterili 4 šulinėlių lėkštelė arba sterilios mažos petri lėkštelės (35 X 10 mm arba analogiškos)
- Vienkartinės pirštinės
- Perkėlimo pipetės
- Chronometras arba laikmatis
- Skystojo azoto talpyklė
- Skystasis azotas
- Pasėlio terpė su baltymais, sušildyta iki 37 °C CO₂ inkubatoriuje prieš atitirpinimo procedūrą
- 37 °C inkubatorius be CO₂ ar šildymo stalo
- Žnyplės

NAUDOJIMO NURODYMAI

„Vit Kit-Thaw“ komponentai (vienam naudojimui)

- 1 ml atitirpinimo tirpalo – TS
- 50 µl skiedimo tirpalo – DS
- 100 µl plovimo tirpalo – WS

ŠILDYMO PROTOKOLAS

PASTABA. Šildymo veiksmams apima prietaiso panardinimą į 37 °C TS ir vėlesnį skiedimą ir plovimą DS ir WS kambario temperatūroje.

1. Nustatykite atitirpinimo lėkštelę (kaip parodyta „Cryolock“ schemoje, 1 pav.):
 - 37 °C temperatūroje: Steriliai užlašinkite ne mažiau kaip 1 ml TS ir pašildykite iki 37 °C inkubatoriuje be CO₂ ar ant kaitinimo stalo bent 30 minučių, prieš pradėdami šildymo procedūrą.
2. Nustatykite norimą (-us) šildyti „Cryolock“ mėginį (-ius) ir greitai perkelti iš LN₂ saugojimo talpyklės į LN₂ pripildytą laikymo talpyklę pasirošiant šildymo procedūrai.
3. Padėkite LN₂ pripildytą laikymo talpyklę netoli darbo srities ir mikroskopo stalo, kad galėtumėte greitai perkelti iš talpyklės į TS.
4. Išimkite TS lėkštelę iš 37 °C inkubatoriaus ar šildymo stalo ir padėkite ją sucentruotą ant mikroskopo stalo viršaus.
5. Žnyplėmis prilaukite „Cryolock“ korpuso viršutinį galą taip, kad identifikavimo etiketė būtų viršuje.
 - A variantas: greitai, bet švelniai nuimkite dangtelį LN₂ aplinkoje, sukdami dalis, kol jos atsilaisvins.
 - B variantas: greitai ištraukite „Cryolock“ iš LN₂, tada greitai švelniai pasukdami nuimkite dangtelį.
- PASTABA. Laboratorija turi peržiūrėti savo procedūras ir protokolus. A varianto negalima naudoti JAV.
6. Nedelsdami panardinkite „Cryolock“ išgaubtą galiuką taip, kad bandinys (-iai) būtų nukreiptas (-i) į viršų, į 37 °C TS. Stebėdami mikroskopu atsargiai judinkite „Cryolock“, kol bandinys (-iai) atsilaisvins iš galiuko.
7. Palikite bandinį (-ius) TS iš viso 1 minutei.
8. Praėjus (30) sekundžių po pradinio panardinimo, jeigu plūduriuoja, švelniai paimkite pipetę bandinį (-ius) ir padėkite TS dugne.
- 9–12 veiksmus reikia atlikti kambario temperatūroje (22–27 °C).
 - Kambario temperatūroje: steriliai užlašinkite vieną (1) 50 µl DS lašą ant sterilios petri lėkštelės (žr. „Cryolock“ schemą, 2 pav.).

9. Perkelkite bandinį (-ius) į DS 4 minutėms. Švelniai pipete paimkite bandinius vieną kartą, kad jie būtų visiškai nuplauti DS.
PASTABA. Bandinius bus susitraukęs, kai jis bus DS.
10. 4 minutes laikant DS, steriliai užlašinkite du (2) 50 µl WS (WS1, WS2) lašus, kaip parodyta paveikslėlyje
11. Perkelkite bandinį (-ius) į WS1, po to – į WS2 po 4 minutes, nemaišydami.
- PASTABA. Bandinis (-iai) turėtų vėl išsiplėsti iki pradinio dydžio pabuvęs (-ę) WS 2–3 minutes.
12. Perkelkite sušildytą (-us) OOCITĄ (-US) į nusistovėjusią kultūros terpę su 20 % (v/v) baltyminio papildo arba 12 mg/ml regeneracijai (2–3 valandoms, kad vėl susiformuotų kaklelis) prieš tolesnes manipuliacijas.
- Pašildytam (-iems) EMBRIONUI (-AMS) yra dvi galimybės:
- a) Skubiai perkelti į pacientę: perkelkite EMBRIONĄ (-US) į iš anksto nusistovėjusią perkėlimo terpę, kurioje yra 20 % (v/v) arba 12 mg/ml baltyminio papildo.
 - b) Toliau auginti: perkelkite EMBRIONĄ (-US) į iš anksto nusistovėjusią auginimo terpę, kurioje yra 20 % (v/v) arba 12 mg/ml baltyminio papildo 4 valandų regeneracijos laikotarpiui. Po regeneracijos laikotarpio perkelkite EMBRIONĄ (-US) į pasėlio terpę su 10 % (v/v) baltymų ir inkubukite atitinkamai, kol bus pasiekta atitinkama vystymosi stadija ir bus galima perkelti pacientei.
- Išsamesnių šių produktų naudojimo gairių kiekviena laboratorija turi ieškoti savo vidaus darbo tvarkos taisyklėse ir metodiniuose nurodymuose, specialiai parengtuose ir optimizuotuose pagal atskiros medicininės programos nuostatas.

LAIKYMO SĄLYGOS IR STABILUMAS

Neatidarytus flakonus laikykite atvėsintus 2–8 °C temperatūroje. Kai laikomi taip, kaip nurodyta, „Vitrification Thaw“ tirpalai išlieka stabilūs iki ant flakono etiketės nurodytos galiojimo pabaigos datos.

Atidarę talpykles, terpsė nenaudokite ilgiau kaip aštuonias (8) savaites.

Kadangi produkte yra žmogaus kilmės medžiagos, laikant gali susidaryti tam tikrų kietųjų dalelių. Nežinoma, ar šios kietosios dalelės turi įtakos produkto veikimui.

ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

Ši priemonė yra skirta naudoti darbuotojams, išmokytiems atlikti pagalbinio apvaisinimo procedūras. Tos procedūros apima priemonės taikymą pagal numatytąją paskirtį.

Šią priemonę naudojanti įstaiga yra atsakinga už produkto atsekamumo duomenų kaupimą ir privalo laikytis savo šalies norminių atsekamumo užtikrinimo reikalavimų, jei taikoma.

Negalima naudoti jokio tirpalo flakono, jei yra pažeidimų, nuotėkis, matyti kietųjų dalelių ar skystis atrodo drumstas arba pakeitė spalvą. Išmeskite produktą pagal taikomus reglamentus.

Norint išvengti užkrėtimo, naudojimo metu reikia laikytis metodinių aseptikos reikalavimų.

Šiuo metu mokslinėje literatūroje nurodoma, kad ilgalaikis vitrifikacijos poveikis oocitams ir embrionams yra nežinomas.

Nenaudokite produkto, jei pažeista sterili buteliuko pakuotė.

ES. Taikomos standartinės priemonės siekiant išvengti infekcijų, kai naudojami iš žmogaus kraujo arba plazmos paruošti vaistiniai preparatai – donorų atranka, individualių donorinių ėminių ir jungtinių plazmos banko mėginių tikrinimas pagal specifinius infekcijų žymenis bei veiksmingi gamybos etapai virusams inaktyvinti arba sunaikinti. Nepaisant to, kai naudojami iš žmogaus kraujo ar plazmos pagaminti vaistiniai preparatai, negalima visiškai atmesti infekuotų medžiagų perdavimo galimybių. Tai taip pat taikytina nežinomiems ar atsirandantiems virusams ir kitoms patogeninėms medžiagoms. Nėra įrodymų apie virusų perdavimą naudojant Europos farmakopėjos specifikacijas atitinkantį albuminą, pagamintą taikant patvirtintus apdorojimo metodus. Primitytinai rekomenduojama kiekvieną kartą skiriant pacientui „Irvine Scientific, LLC“ reprodukcinę mitybos terpę užrašyti produkto pavadinimą ir partijos numerį, kad būtų galima susieti pacientą ir produkto partiją.

JAV. Šio produkto sudėtyje yra žmogaus serumo albumino (ŽSA). Šį produktą gaminant naudotos žmogaus kilmės medžiagos buvo ištirtos taikant JAV maisto ir vaistų administracijos (FDA) patvirtintus reagentų rinkinius, ir nustatyta, kad jos nereaktyvios hepatito C viruso (HCV) antikūnų atžvilgiu ir žmogaus imunodeficitą viruso (ŽIV) antikūnų atžvilgiu. Visgi joks tyrimo metodas nesuteikia visapusiškų garantijų, kad iš žmogaus kilmės medžiagų pagamintuose preparatuose nėra infekcinių ligų sukėlėjų. Visas žmogiškos kilmės medžiagas tvarkykite taip, lyg jos galėtų pernešti infekciją, naudodami visuotines atsargumo priemones. Taip pat buvo ištirta, ar preparatų žaliavos medžiagų donorai nėra užsikrėtę Kroicfeldo-Jakobo liga.

KONTRAINDIKACIJOS

Produkto sudėtyje yra gentamicino sulfato. Būtina imtis tinkamų atsargumo priemonių užtikrinant, kad pacientas nėra alergiškas šiam antibiotikui.

AB İÇİN DİKKAT: Sadece Mesleki Kullanım İçindir.

KULLANIM ENDİKASYONU

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) ürününün Vitrification Freeze Kit (Katalog no 90133-SO) kullanılarak vitrifiye edilmiş gün 3 klivaj evresi embriyolar ve blastokist evresi embriyolara kadar pronükleer (PN) zigotlar ve vitrifiye oositlerin (MII) çözülmesinde kullanılması amaçlanmıştır.

CİHAZ TANIMI

Thawing Solution-TS, Gentamisin Sülfat, 1,0 M sükröz ve %20 (h/h) Dekstran Serum Takviyesi (DSS) içeren bir HEPES tamponlu Medium-199 solüsyonudur.

Dilution Solution-DS, Gentamisin Sülfat, 0,5 M sükröz ve %20 (h/h) DSS içeren bir HEPES tamponlu Medium-199 solüsyonudur.

Washing Solution-WS, Gentamisin Sülfat ve %20 (h/h) DSS içeren bir HEPES tamponlu Medium-199 solüsyonudur.

DSS, 50 mg/mL terapötik sınıf İnsan Serum Albumini (İSA) ve 20 mg/mL Dekstrandan oluşan bir protein takviyesidir. DSS, 10 mg/mL HSA ve 4 mg/mL Dekstran son konsantrasyonu için Vit Kit-Thaw içinde %20 (h/h) değerinde kullanılır.

Bu üç solüsyon kademeli mikrodamlı ısıtma protokolüne göre sırayla kullanılacaktır.

BİLEŞİM

Tuzlar ve İyonlar

Sodyum Klorür

Sodyum Fosfat

Potasyum Klorür

Magnezyum Sülfat

Sodyum Asetat

Kalsiyum Klorür

Ferrik Nitrat

Kolin Klorür

Vitaminler ve Mineraller

Askorbik Asit

Aminobenzoik Asit

Kalsiferol

Folik Asit

Nikotinik Asit

Nikotinik Asit Amid

Pantotenik Asit

Riboflavin

Piridoksin

Tiyamin

Biyotin

Alfa Tokoferol

Sodyum Bisülfat

Antioksidan

Glutatyon

Antibiyotik

Gentamisin Sülfat

Enerji Substratları

Glukoz

Inositol

Protein Kaynağı

İnsan Serum Albumini

Tamponlar

Sodyum Bikarbonat

HEPES

pH Göstergesi

Fenol Kırmızısı

Makromoleküller

Sükröz

Dekstran

Amino Asitler

Arjinin

Glisin

Histidin

Lizin

Prolin

Tirozin

Alanin

Aspartik Asit

Glutamik Asit

İzölösün

Lösün

Metiyonin

Fenilalanin

Serin

Treonin

Triptofan

Valin

Sistein

Hidroksiprolin

Sistin

Diğer

Guanin

Hipoksantin

Timin

Urasil

Ksantin

Adenozin

Adenin Sülfat

Deoksiriboz

Riboz

Su

Enjeksiyonluk Su Kalitesi

KALİTE GÜVENÇE

Vit Kit-Thaw içindeki solüsyonlar doğrulanmış üretim işlemlerine göre membrandan filtrelenmiş ve aseptik olarak işlenmiştir.

Her Vit Kit-Thaw lotu şu testlerden geçer:

Çözümler:

Limulus Amebosit Lizat (LAL) metodolojisi ile endotoksin ($\leq 0,6$ EU/mL)

Fare Embriyo Testi (tek hücre) ($\geq \%80$ genişlemiş Blastokist)

Mevcut USP Sterilite Testi $<71>$ ile sterilite (Geçti)

Tüm sonuçlar istek üzerine sağlanabilecek, lota spesifik bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

TAŞIYICI OLARAK CRYOTIP ISITMAK İÇİN:

GEREKLİ AMA DAHİL EDİLMİYEN MATERYAL

- Konektör (Katalog no 40736) veya adaptör
- Steril petri tabakları (50 X 9 mm, Falcon 351006 veya eşdeğeri)
- Tek kullanımlık eldivenler
- Hamilton GASTIGHT® Şırıngası (50 µL) Katalog no 80901
- Transfer pipetleri (iç uç çapı ~200 µm olan çekme cam pipetler veya mikropipet uçları)
- Cımbız
- Kronometre veya zamanlayıcı
- Sıvı nitrojen rezervuarı (kapaklı tank veya styrofoam kap, 1-2 L hacim)
- Sıvı nitrojen (rezervuarda 4 inç (10 cm) derinlik elde etmeye yetecek hacim)
- Keskin makas (steril)
- 37°C su banyosu
- Çözme işlemi öncesinde CO₂ inkübatöründe 37°C sıcaklığa ön dengelenme yapılmış proteinli kültür vasatı.
- CO₂ olmayan 37°C inkübatör veya ısıtma tablası.

KULLANMA TALİMATI

Vit Kit-Thaw bileşenleri (uygulama başına):

- 50 µL Thawing Solution-TS
- 50 µL Dilution Solution-DS
- 100 µL Washing Solution-WS
- 1 Konektör

ISITMA PROTOKOLÜ

(OOSİTLER VE EMBRİYOLAR İÇİN):

- NOT: İşlemler oda sıcaklığında (20°C - 27°C) yapılacaktır. Aşağıdaki işlemler için ısıtılmış mikroskop tablasını KULLANMAYIN. DİKKAT: Çözme solüsyonlarında manipülasyonlar sırasında numunenin ışığa maruz kalmasını en aza indirin.
1. Vitriye numuneleri ısıtmadan önce kullanılacak TS, DS ve WS miktarını oda sıcaklığına (20°C - 27°C) getirin.
NOT: Her seferinde solüsyonun küçük bir miktarı gerektiğinde tüm TS, DS ve WS flakonlarını tekrar tekrar oda sıcaklığına getirmekten kaçının. Kullanılacak miktarı ayırıp bu ayırma işleminden hemen sonra flakonları tekrar 2°C - 8°C'ye koymak daha iyi olur.
 2. Sıvı nitrojen rezervuarını sıvı nitrojenle doldurun (~%80 dolu) ve çözülecek numuneleri içeren LN₂ dondurucusunun yakınına yerleştirin.
 3. Sıvı nitrojen deposundan vitriye numunelerle CryoTip cihazlarını içeren gobletlerle çubukları çıkarın ve sıvı nitrojenle doldurulmuş rezervuara aktarın.
DİKKAT: Numunelerin kontrolsüz bir şekilde çözülmesini önlemek için CryoTip cihazlarının saklama durumundan LN₂ rezervuarına aktarılması sırasında LN₂'ye batırılmış olarak (goblet içinde) kaldığından emin olun.
Hızlı manipülasyon için rezervuarı mikroskobun yakınına yerleştirin.
 4. Steril bir petri tabağını (veya kapağını) gerekli bilgilerle etiketleyin.
 5. Kullanım öncesinde içeriği karıştırmak için her TS, DS ve WS flakonunu iki kez yavaşça ters düz edin.
 6. Isıtma protokolü için solüsyon damlaları içeren tabağı şu şekilde hazırlayın:
Şekil 1'de gösterildiği gibi steril petri tabağının ters çevrilmiş kapağına 2 mikrodamlı dizisini aseptik olarak koyun ve tabağı mikroskop tablasına yerleştirin:
 - bir 50 µL TS damlası
 - bir 50 µL DS damlası
 - (iki damla WS daha sonra adım 11'de hazırlanacaktır)
 7. 37°C su banyosunu mikroskobun yakınına yerleştirin. Aşağıdakileri yakınızdaki bulundurun: bir transfer pipeti ve uçları, steril keskin makas, Hamilton şırıngası ve steril mendiller.
 8. Cımbız (veya maşa) kullanarak belirli CryoTip cihazını sıvı nitrojen içindeki çubuktan alın, CryoTip cihazını 37°C su banyosuna (≥ 500 mL) hızla batırın ve + 24000°C/dk hızında ısınması için 3 saniye yavaşça çevirin (bakınız Şekil 2).
 9. CryoTip içeriğini şu şekilde hızla atın (bakınız Şekil 3):
 - CryoTip cihazını steril bir mendille hızla silip kurutun
 - Metal örtme kılıfını çıkarın
 - CryoTip geniş ucunda işaret no 4'te mührü kesin
 - CryoTip cihazının geniş ucunu bir konektör veya adaptör kullanarak Hamilton şırıngası veya uygun aspirasyon aracına sağlamca tutturun.
NOT: Şırıngayı Konektör ve CryoTip cihazına takmadan önce şırınga pistonunu yaklaşık 0,5 inç (1,3 cm) çekin.
 - İnce ucu steril bir mendille yavaşça silin.
 - CryoTip cihazı hazırlanmış çözme tabağının üzerinde konumlandırılmış olarak ince uçta işaret no 2 üzerindeki mührü hızla kesin ve CryoTip cihazındaki tabakta TS damlası üzerindeki kuru bir bölgeye küçük bir damla (~ 1 µL) halinde koyun (bakınız Şekil 4).
 - NOT: İÇERİĞİ VERİRKEN KABARCIKLARDAN KAÇININ.
 10. TS damlasını CryoTip içeriğiyle birleştirin ve 1 dakika boyunca giderek karışmasını bekleyin (bakınız Şekil 4).
NOT: Numuneler küçülür ve damlanın tepesine çıkar.
NOT: Numunenin/numunelerin her transferinden sonra transfer pipetinde kalan herhangi bir sıvıyı dışarı atın ve sonraki manipülasyon öncesinde sonraki damladan biraz solüsyon çekin. Transferler sırasında kabarcık oluşturmaktan kaçının.
 11. Transfer pipetine biraz DS çekin ve numuneyi/numuneleri TS damlasından minimum hacimle DS damlasına 4 dakikalığına aktarın.
NOT: Numune, DS'ye maruz kalma sırasında küçülmüş olarak kalacaktır.
BU SÜRE İÇİNDE ŞEKİL 4'TE GÖSTERİLDİĞİ GİBİ İKİ 50 µL WS (WS1, WS2) DAMLASI HAZIRLAYIN.
 12. Numuneyi/numuneleri 4 dakikalığına WS (WS1) damlasına aktarın.
NOT: Numunenin/numunelerin WS içinde 2-3 dakikada orijinal büyüklüğüne tekrar genişlemesi gerekir.
 13. Sonra numuneyi/numuneleri 4 dakikalığına ikinci WS (WS2) damlasına aktarın.
 14. Isıtılmış OOSİTİ/OOSİTLERİ sonraki manipülasyonlar öncesinde düzelleme için %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş kültür vasatına aktarın (tekrar mekik oluşmasına süre tanımak için 2-3 saat).
Isıtılmış EMBRİYO/EMBRİYOLAR için iki seçenek vardır:
 - a) Hastaya hemen aktarmak için: EMBRİYOYU/EMBRİYOLARI %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş 'transfer' vasatına aktarın.
 - b) Daha fazla kültür için: EMBRİYOYU/EMBRİYOLARI 4 saatlik düzelleme dönemi için %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş kültür vasatına aktarın. Düzelleme dönemi sonrasında EMBRİYOYU/EMBRİYOLARI %10 (h/h) protein içeren kültür vasatına aktarın ve hastaya aktarmak için istenen gelişme evresine ulaşıncaya kadar uygun şekilde inkübe edin.

TAŞIYICI OLARAK HSV CİHAZI ISITMAK İÇİN:

GEREKLİ AMA DAHİL EDİLMİYEN MATERYAL

- Steril 4 kuyulu tabak (Nunc 179830, 144444 veya eşdeğeri) veya organ kültürü tabağı (BD Falcon 353037)
- Tek kullanımlık eldivenler
- Transfer pipetleri
- Cımbız
- Kronometre veya zamanlayıcı
- Sıvı nitrojen rezervuarı
- Sıvı nitrojen
- Makas, Knipex veya diğer tel kesme cihazı
- Çözme işlemi öncesinde CO₂ inkübatöründe 37°C sıcaklığa ön dengeleme yapılmış proteinli kültür vasatı.
- CO₂ olmayan 37°C inkübatör veya ısıtma tablası

KULLANMA TALİMATI

Vit Kit-Thaw bileşenleri (uygulama başına)

- 250 µL Thawing Solution-TS
- 50 µL Dilution Solution-DS
- 100 µL Washing Solution-WS

ISITMA PROTOKOLÜ

(OOSİTLER VE EMBRİYOLAR İÇİN):

- NOT: Isıtma adımları, cihazı 37°C TS içine batırmayı ve ardından oda sıcaklığında DS ve WS ile seyreletmeyi ve yıkamayı içerir
- Isıtma tabaklarını hazırlayın (HSV cihazı şemasında gösterildiği gibi):
 - 37°C'de: Steril 4 kuyulu bir tabak veya bir organ kültürü tabağına aseptik olarak minimum 250 µL hacimde TS koyun ve ısıtma işlemine başlamadan en az 30 dakika önce CO₂ olmayan bir 37°C inkübatör veya bir ısıtma tablasına yerleştirin
 - NOT: Oositler için minimum 1 mL TS koyun
 - LN₂ içinde saklanmış durumdaki ısıtılacak HSV Straw ürününü/ürünlerini tanımlayın ve çözme işlemine hazırlık olarak LN₂ doldurulmuş bir rezervuara hızla aktarın.
 - LN₂ rezervuarını daha sonra hızlı manipülasyon için mikroskobun yakınına yerleştirin.
 - 37°C inkübatör veya ısıtma tablasından TS tabağı alın ve mikroskop tablasının üstünde, odaklanılacak şekilde yerleştirin.
 - Kamışı renkli muamele çubuğunu ortaya çıkaracak kadar kaldırın. Numunenin/numunelerin bulunduğu ucun LN₂'ye batırılması olarak kaldığından emin olun.
 - Kamışı renkli muamele çubuğu yüksekliğinde kesmek için bir Knipex (veya başka bir tel kesme cihazı) kullanın. Knipex üzerindeki kırmızı kesme uzunluğu kılavuzu maksimum uzunluk pozisyonuna getirilmeli veya çıkarılmalıdır.
 - Alternatif olarak renkli muamele çubuğunun üst kısmının 10 mm altında makasla kesme hareketleri yaparken kamışı döndürmek için başparmağınızı ve parmaklarınızı kullanın.
 - Tek bir hızlı ama kontrollü hareketle muamele çubuğunu hızla tutup kamıştan çıkarın.
 - Oluğu hemen 37°C TS içine batırın ve numuneleri cihazdan ayırmak için yavaşça çevirip 1 dakikalığına bırakın.
- Adım 9-12 oda sıcaklığında (22-27°C) yapılmalıdır.
- Oda sıcaklığında: Steril bir petri tabağına aseptik olarak bir (1) 50 µL DS damlası koyun
- Transfer pipetine biraz DS çekin ve numuneyi/numuneleri TS damlasından minimum hacimle DS damlasına 4 dakikalığına aktarın.
- NOT: Numune, DS'ye maruz kalma sırasında küçülmüş olarak kalacaktır.
- BU SÜRE İÇİNDE HSV CİHAZI ŞEMASINDA GÖSTERİLDİĞİ GİBİ İKİ 50 µL WS (WS1, WS2) DAMLASI HAZIRLAYIN.
- Numuneyi/numuneleri 4 dakikalığına WS (WS1) damlasına aktarın.
- NOT: Numunenin/numunelerin WS içinde 2-3 dakikada orijinal büyüklüğüne tekrar genişlemesi gerekir.
- Sonra numuneyi/numuneleri 4 dakikalığına ikinci WS (WS2) damlasına aktarın.
- Isıtılmış OOSİTİ/OOSİTLERİ sonraki manipülasyonlar öncesinde düzleme için %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş kültür vasatına aktarın (tekrar mekik oluşmasına süre tanımak için 2-3 saat).
- Isıtılmış EMBRİYO/EMBRİYOLAR için iki seçenek vardır:
- a) Hastaya hemen aktarmak için: EMBRİYOYU/EMBRİYOLARI %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş 'transfer' vasatına aktarın.
 - b) Daha fazla kültür için: EMBRİYOYU/EMBRİYOLARI 4 saatlik düzleme dönemi için %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş kültür vasatına aktarın. Düzleme dönemi sonrasında EMBRİYOYU/EMBRİYOLARI %10 (h/h) protein içeren kültür vasatına aktarın ve hastaya aktarmak için istenen gelişme evresine ulaşılıncaya kadar uygun şekilde inkübe edin.
- NOT: Düzelen oositler vitrifikasyon sonrasında optimum fertilizasyon için ICSI kullanarak fertilize edilmelidir.

TAŞIYICI OLARAK CRYOLOCK™ ISITMAK İÇİN:

GEREKLİ AMA DAHİL EDİLMİYEN MATERYAL

- Steril 4 kuyulu tabak veya steril küçük petri tabakları (35 X 10 mm veya eşdeğeri)
- Tek kullanımlık eldivenler
- Transfer pipetleri
- Kronometre veya zamanlayıcı
- Sıvı nitrojen rezervuarı
- Sıvı nitrojen
- Çözme işlemi öncesinde CO₂ inkübatöründe 37°C sıcaklığa ön dengelenme yapılmış proteinli kültür vasatı
- CO₂ olmayan 37°C inkübatör veya ısıtma tablası
- Forseps

KULLANMA TALİMATI

Vit Kit-Thaw bileşenleri (uygulama başına)

- 1 mL Thawing Solution-TS
- 50 µL Dilution Solution-DS
- 100 µL Washing Solution-WS

ISITMA PROTOKOLÜ

NOT: Isıtma adımları, cihazı 37°C TS içine batırmayı ve ardından oda sıcaklığında DS ve WS ile seyreletmeyi ve yıkamayı içerir

- Çözme tabağını hazırlayın (Cryolock şeması Şekil 1'de gösterildiği gibi):
 - 37°C'de: Aseptik olarak minimum 1 mL hacimde TS koyun ve ısıtma işlemine başlamadan en az 30 dakika önce CO₂ olmayan bir inkübatör veya bir ısıtma tablasında 37°C'ye ısıtın.
 - Isıtılacak Cryolock örneğini/örneklerini tanımlayın ve ısıtma işlemine hazırlık olarak LN₂ içinde saklanmış durumdan LN₂ doldurulmuş bir tutma rezervuarına hızla aktarın.
 - LN₂ doldurulmuş tutma rezervuarını daha sonra rezervuardan TS'ye hızlı manipülasyon yapabilmek için mikroskop tablası ve çalışma alanına çok yakın olarak yerleştirin.
 - 37°C inkübatör veya ısıtma tablasından TS tabağı alın ve mikroskop tablasının üstünde, odaklanılacak şekilde yerleştirin.
 - Forseps kullanarak Cryolock gövdesinin üst ucunu, tanımlama etiketi yukarıya bakacak şekilde tutun.
 - Seçenek A: Kapağı LN₂ altında parçaları serbest kalıncaya kadar çevirerek hızla ama güç uygulamadan çıkarın.
 - Seçenek B: Cryolock cihazını hızla LN₂ dışına çıkarın ve sonra kapağı güç uygulamadan çevirerek hızla çıkarın.
- NOT: Her laboratuvar kendi işlemleri ve protokollerine başvurmalıdır. Seçenek A, ABD'de kullanım için onaylı değildir.
- Cryolock konkav ucunu numune/numuneler yukarı bakacak şekilde hemen 37°C TS içine batırın. Mikroskopik gözlem altında Cryolock cihazını numune/numuneler uçtan serbest bırakılıncaya kadar yavaşça hareket ettirin.
 - Numuneyi/numuneleri TS içinde toplam 1 dakika bırakın.

8. İlk batırmadan otuz (30) saniye sonra varsa yüzen numuneyi/numuneleri yavaşça pipetleyin ve TS dibine yerleştirin. Adım 9-12 oda sıcaklığında (22-27°C) yapılmalıdır.
- Oda sıcaklığında: Steril bir petri tabağına aseptik olarak bir (1) 50 µL DS damlası koyun (bakınız Cryolock şeması, Şekil 2).
9. Numuneyi/numuneleri 4 dakikalığına DS'ye aktarın. DS içinde tamamen yıkanmayı sağlamak üzere numuneleri bir kez yavaşça pipetleyin.

NOT: Numune, DS'ye maruz kalma sırasında küçülmüş olarak kalacaktır.

10. DS'ye 4 dakikalık maruz kalma sırasında şemada gösterildiği gibi aseptik olarak iki (2) 50 µL WS (WS1, WS2) damlası koyun.

11. Numuneyi/numuneleri bozmadan her biri 4 dakikalığına WS1 ve sonra WS2'ye aktarın.

NOT: Numunenin/numunelerin WS içinde 2-3 dakikada orijinal büyüklüğüne tekrar genişlemesi gerekir.

12. Isıtılmış OOSİTİ/OOSİTLERİ sonraki manipülasyonlar öncesinde düzelleme için %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş kültür vasatına aktarın (tekrar mekik oluşmasına süre tanımak için 2-3 saat).

Isıtılmış EMBRİYO/EMBRYOLAR için iki seçenek vardır:

- a) Hastaya hemen aktarmak için: EMBRİYOYU/EMBRYOLARI %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş 'transfer' vasatına aktarın.
- b) Daha fazla kültür için: EMBRİYOYU/EMBRYOLARI 4 saatlik düzelleme dönemi için %20 (h/h) protein takviyesi veya 12 mg/mL içeren önceden dengelenmiş kültür vasatına aktarın. Düzelleme dönemi sonrasında EMBRİYOYU/EMBRYOLARI %10 (h/h) protein içeren kültür vasatına aktarın ve hastaya aktarmak için istenen gelişme evresine ulaşıncaya kadar uygun şekilde inkübe edin.

Bu ürünlerin kullanımı hakkında ek ayrıntılar için her laboratuvar kendi tıbbi programınıza göre özellikle geliştirilmiş ve optimize edilmiş kendi laboratuvar işlemleri ve protokollerine başvurmaldır.

SAKLAMA TALİMATI VE STABİLİTE

Açılmamış flakonları 2°C ile 8°C arasında buzdolabında saklayın. Talimattaki gibi saklandığında Vitrication Thaw Kit Solüsyonları flakon etiketlerinde gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

Kaplar açıldıktan sonra vasatı sekiz (8) haftadan fazla kullanmayın.

Üründe insan kaynaklı materyal bulunduğundan saklama sırasında bir miktar partikül madde gelişebilir. Bu partikül madde tipinin ürün performansı üzerine bir etkisi bilinmemektedir.

ÖNLEMLER VE UYARILAR

Bu cihazın yardımcı üreme işlemleri konusunda eğitilmiş personelce kullanılması amaçlanmıştır. Bu işlemlere bu cihazın kullanımının amaçlandığı, amaçlanmış uygulama dahildir.

Bu cihazı kullanan tesis, ürünün izlenebilirliğinin sürdürülmesinden sorumludur ve geçerliyse izlenebilirlikle ilgili ulusal düzenlemelere uymak zorundadır.

Hasar, sızıntı, partikül madde veya bulanıklık bulguları gösteren veya rengi değişmiş herhangi bir solüsyon flakonunu kullanmayın. Ürünü ilgili düzenlemelerle uyumlu olarak atın.

Kontaminasyon sorunlarından kaçınmak için aseptik tekniklerle kullanın.

Şu anda araştırma literatürü vitrifikasyonun oositler ve embriyolar üzerinde uzun dönemli etkilerinin halen bilinmemekte olduğuna işaret etmektedir.

Steril ambalajın olumsuz etkilendiği herhangi bir şeyi kullanmayın.

AB: İnsan kanı veya plazmasından hazırlanan tıbbi ürünlerin kullanımından kaynaklanan enfeksiyonların önlenmesi için alınan standart önlemler arasında donörlerin seçimi, bireysel bağışların ve plazma havuzlarının belirli enfeksiyon göstergeleri için takibi ve virüslerin inaktivasyonu/uzaklaştırılması için etkili üretim aşamalarının kullanılması yer almaktadır. Bunlara rağmen insan kanı veya plazmasından hazırlanan tıbbi ürünler uygulandığında bulaşıcı ajanlar iletmeye olasıdır. Bu ayrıca bilinmeyen veya yeni çıkan virüsler ve diğer patojenler için de geçerlidir. Yerleşmiş süreçlerle Avrupa Farmakopisi spesifikasyonlarına göre üretilen albuminle ispatlanmış virüs bulaşması raporu yoktur. Bir Irvine Scientific, LLC Üreme Vasatı Ürünleri kültür vasatının bir hastaya her uygulanmasında ürünün isim ve parti numarasının hasta ile ürün partisi arasında bir bağlantıyı sürdürmek açısından kaydedilmesi kuvvetle önerilir.

ABD: Bu ürün İnsan Serum Albumini (ISA) içerir. Bu ürünün üretilmesinde kullanılan insan kaynaklı materyal FDA lisanslı kitlelerle test edilmiş ve Hepatit C (HCV) antikorları ve İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV) antikorları açısından reaktif olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte hiçbir test yöntemi insan kaynaklarından türetilen ürünlerin bulaşıcı olmadığı konusunda tam güvence sunmaz. Tüm insan kaynaklı materyali evrensel önlemler kullanılarak ve enfeksiyon bulaştırabilirliği gibi kullanın. Kaynak materyal donörleri CJD için de taranmıştır.

KONTRENDİKASYON

Ürün Gentamisin Sülfat içerir. Hastanın bu antibiyotiğe karşı hassas olmadığından emin olmak için gerekli önlemler alınmalıdır.

UPOZORNENIE V EÚ: Len na profesionálne použitie.

INDIKÁCIA NA POUŽITIE

Vit Kit-Thaw (súprava Vitrifikačný Thaw) je určená na použitie pri rozmrazovaní vitrifikovaných oocytov (MII), pronukleárných (PN) zygot až po 3-dňové embryá v štádiu ryhovania a embryí v štádiu blastocysty, ktoré boli vitrifikované pomocou súpravy Vitrefikácia Freeze (katalógové č. 90133-SO)

POPIS ZARIADENIA

Thawing Solution-TS je HEPES-pufrovaný roztok média 199, obsahujúceho gentamicínsulfát, 1,0 M sacharózy a 20 % (v/v) doplnku so sérovým dextranom (DSS).

Dilution Solution-DS je HEPES-pufrovaný roztok média 199, obsahujúceho gentamicínsulfát, 0,5 M sacharózy a 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS je HEPES-pufrovaný roztok média 199, obsahujúceho gentamicínsulfát a 20 % (v/v) DSS.

DSS je bielkovinový doplnok, skladajúci sa z 50 mg/ml ľudského sérového albumínu (HSA) terapeutickú kvalitu a 20 mg/ml dextranu. DSS sa používa pri 20% (v/v) v súprave Vit Kit-Thaw na výslednú koncentráciu 10 mg/ml HSA a 4 mg/ml dextranu.

Tieto tri roztoky sa musia používať v poradí určenom protokolom na postupné zahrievanie mikrovkoviek.

ZLOŽENIE

Soli a ióny	amid kyseliny nikotinovej	Zdroj bielkovín	lyzín	hydroxyprolín
chlorid sodný	kyselina pantoténová	ľudský sérový albumín	prolín	cystín
fosfát sodný	riboflavín	Pufre	tyrozín	Iné
chlorid draselný	pyridoxín	hydrogenuhličitán sodný	alanín	guanín
síran horečnatý	tiámín	HEPES	kyselina asparágová	hypoxantín
octan sodný	biotín	Indikátor pH	kyselina glutámová	tymin
chlorid vápenatý	alfa-tokoferol	fenolová červená	izoleucín	uracil
disíčan železitý	hydrogénsiričitán sodný	Makromolekuly	leucín	xantín
cholín vápenatý	Antioxidant	sacharóza	metionín	adenozín
Vitamíny a minerály	glutathión	dextran	fenylalanín	adenín sulfát
kyselina askorbová	Antibiotikum	Aminokyseliny	serín	deoxyribóza
kyselina aminobenzoová	gentamicínsulfát	arginín	treonín	ribóza
kalciferol	Energetické substráty	glycín	tryptofán	Voda
kyselina listová	glukóza	histidín	valín	kvalita vody na injekciu
kyselina nikotínová	inositol		cysteín	

KONTROLA KVALITY

Roztoky v súprave Vit Kit-Thaw sú filtrované cez membránu a asepticky spracované podľa výrobných postupov, ktoré boli overené.

Každá šarža Vit Kit-Thaw prešla nasledujúcimi skúškami:

Roztoky:

- endotoxín pomocou testu amébocytového lyzátu z ostrépea amerického (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)
- test sterility embryí myši (v jednej bunke) (≥ 80 % expandovanej blastocysty)
- sterilita pomocou aktuálneho testu sterility USP <71> (splnené)

Všetky výsledky sa zaznamenávajú na certifikát analýzy pre špecifickú šaržu, ktorý je dostupný na požiadanie.

NA ZAHRIEVANIE KRYOŠPIČKY AKO NOSIČA:

VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Konektor (katalógové č. 40736) alebo adaptér
- Sterilné Petriho misky (50 x 9 mm, Falcon 351006 alebo ekvivalentné)
- Jednorazové rukavice
- Striekačka Hamilton GASTIGHT® (50 µl), katalógové č. 80901
- Prenosové pipety (pipety z ťahaného skla alebo špičky mikropipet s vnútorným priemerom špičky ~200 µm)
- Pinzeta
- Stopky alebo časomer
- Zásobník tekutého dusíka (Dewarova alebo polystyrénová nádoba s vekom, objem 1 – 2 l)
- Tekutý dusík (dostatočný objem na dosiahnutie hĺbky 4 palce (10 cm) v zásobníku)
- Ostré nožnice (sterilné)
- Vodný kúpeľ s teplotou 37 °C
- Kultivačné médium s bielkovinou, vopred ustálené na 37 °C v inkubátore s CO₂ pred rozmrazovacím postupom
- 37 °C inkubátor bez CO₂ alebo zahrievací stôl

NÁVOD NA POUŽITIE

Časti súpravy Vit Kit-Thaw (na jednu aplikáciu):

- 50 µl roztoku Thawing Solution-TS
- 50 µl roztoku Dilution Solution-DS
- 100 µl roztoku Washing Solution-WS
- 1 konektor

PROTOKOL ZAHRIEVANIA

(PRE OOCYTY A EMBRYÁ):

- POZNÁMKA:** Postupy sa musia vykonávať pri izbovej teplote (20 °C – 27 °C). Na nasledujúce postupy NEPOUŽÍVAJTE zahriaty stolík mikroskopu.
- UPOZORNENIE:** Počas manipulácie s rozmrazovacími roztokmi minimalizujte expozíciu vzorky svetlu.
- Množstvo roztokov TS, DS a WS, ktoré sa má použiť, vyteperujte na izbovú teplotu (20 °C – 27 °C) pred zahriatím vitrifikovaných vzoriek.
 - POZNÁMKA:** Celé skúmavky s roztokmi TS, DS a WS opakovane netemperujte na izbovú teplotu, keď je zakaždým potrebné len malé množstvo roztoku. Je lepšie alikvotovať množstvo, ktoré sa má použiť, a skúmavky vrátiť do teploty 2 °C – 8 °C hneď po alikvotovaní.
 - Zásobník tekutého dusíka naplňte tekutým dusíkom (~80 % doplna) a umiestnite do blízkosti mrazničky LN₂ obsahujúcej vzorky na rozmrazenie.
 - Vyberte tyčinky s pohárikmi obsahujúce kryošpičky s vitrifikovanými vzorkami z nádoby s tekutým dusíkom a preneste ich do zásobníka naplneného tekutým dusíkom.
 - UPOZORNENIE:** Dajte pozor, aby počas prenosu z nádoby do zásobníka s LN₂ kryošpičky zostali ponorené v LN₂ (v poháriku), aby nedošlo k nekontrolovanému rozmrazeniu vzoriek. Zásobník umiestnite do blízkosti mikroskopu na rýchlu manipuláciu.
 - Sterilnú Petriho misku (alebo vrchnák) označte potrebnými informáciami.
 - Každú skúmavku s roztokmi TS, DS a WS pred použitím dvakrát jemne preklopte, aby sa premiešal obsah.
 - Pripravte misku s kvapkami roztokov na zahrievací protokol nasledovným spôsobom:
Asepticky nadávkujte sekvenciu 2 mikrokvapiek na prevrátený vrchnák sterilnej Petriho misky tak, ako je ukázané na obrázku 1, a misku položte na stolík mikroskopu:
 - jednu 50 µl kvapku roztoku TS
 - jednu 50 µl kvapku roztoku DS
 - (dve kvapky WS budú pripravené neskôr v kroku 11)
 - Vodný kúpeľ s teplotou 37 °C umiestnite do blízkosti mikroskopu. Majte poruke nasledovné: prenosovú pipetu a špičky, sterilné ostré nožnice, Hamiltonovu striekačku a sterilné utierky.
 - Pomocou pinzety (alebo klieštikov) vyberte špecifickú kryošpičku z tyčinky v tekutom dusíku, rýchlo ponorte kryošpičku do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C (≥ 500 ml) a zľahka ňou vrtíte 3 sekundy, aby sa zahriala (pozri obrázok 2) na +24 000 °C/min.
 - Rýchlo nadávkujte obsah kryošpičky nasledujúcim spôsobom (pozri obrázok 3):
 - Rýchlo utrite kryošpičku sterilnou utierkou
 - Odstraňte kovové krycie puzdro
 - Odstrihnite tesnenie na širokom konci kryošpičky pri značke č. 4
 - Široký koniec kryošpičky pevne pripojte k Hamiltonovej striekačke alebo vhodnému aspiračnému nástroju pomocou konektora alebo adaptéra.
 - POZNÁMKA:** Skôr, než striekačku pripojíte ku konektoru a kryošpičke, nadvihnite piest striekačky o približne 0,5 palca (1,3 cm).
 - Jemnú špičku zľahka utrite dosucha sterilnou utierkou
 - Keď je kryošpička umiestnená nad pripravenú rozmrazovaciu misku, rýchlo odstrihnite zapečatenie pri značke č. 2 na jemnom konci špičky a obsah kryošpičky nadávkujte ako malú kvapku (~ 1 µl) na suchú časť misky nad kvapku TS (pozri obrázok 4).
 - POZNÁMKA: PRI DÁVKOVANÍ OBSAHU DAJTE POZOR, ABY SA NEVYTVOŘILI BUBLINY.**
 - Kvapku TS spojte s obsahom kryošpičky a nechajte ich postupne zmiešať 1 minútu (pozri obrázok 4).
Poznámka: Vzorky sa scvrknú a vyplávajú na povrch kvapky.
 - POZNÁMKA:** Po každom prenose vzorky vyfúknite všetky zvyšky tekutiny z prenosovej pipety a natiahnite trochu roztoku z nasledujúcej kvapky pred ďalšou manipuláciou. Dajte pozor, aby sa počas prenosov nevytvorili bubliny.
 - Natiahnite trochu roztoku DS do prenosovej pipety a preneste vzorky z kvapky roztoku TS s minimálnym objemom do kvapky roztoku DS na 4 minúty.
POZNÁMKA: Počas expozície roztoku DS zostane vzorka scvrknutá.
 - POČAS TEJTO DOBY PRIPRAVTE DVE 50 µl KVAPKY ROZTOKU WS (WS1, WS2) TAK, AKO JE UKÁZANÉ NA OBRÁZKU 4.**
 - Preneste vzorky do kvapky roztoku WS (WS1) na 4 minúty.
 - POZNÁMKA:** Vzorky by sa mali znovu rozliahnúť na pôvodnú veľkosť do 2 – 3 minút v roztoku WS.
 - Potom preneste vzorky do druhej kvapky roztoku WS (WS2) na 4 minúty.
 - Zahriate OOCYTY preneste do vopred ustáleného kultivačného média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml na obnovu (2 – 3 hodiny, aby sa ponechal dostatok času na opätovné vytvorenie vretena) pred ďalšou manipuláciou.
- Pre zahriate EMBRYÁ existujú dve možnosti:
- Na okamžitý prenos do pacientky: EMBRYÁ preneste do vopred ustáleného „prenosového“ média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml.
 - Na ďalšiu kultiváciu: EMBRYÁ preneste do vopred ustáleného kultivačného média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml na 4-hodinovú dobu obnovy. Po dobe obnovy EMBRYÁ preneste do kultivačného média s 10 % (v/v) bielkoviny a primerane inkubujte, kým sa nedosiahne požadované vývojové štádium na prenos do pacientky.

NA ZAHRIEVANIE ZARIADENIA HVS AKO NOSIČA:

VÝŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Sterilná 4-jamková miska (Nunc 179830, 144444 alebo ekvivalentné), alebo orgánová kultivačná miska (BD Falcon 353037)
- Jednorazové rukavice
- Prenosové pipety
- Pinzeta
- Stopky alebo časomer
- Zásobník tekutého dusíka
- Tekutý dusík
- Nožnice, kliešte alebo iná pomôcka na strihanie drôtov
- Kultivačné médium s bielkovinou, vopred ustálené na 37 °C v inkubátore s CO₂ pred rozmrazovacím postupom
- 37 °C inkubátor bez CO₂ alebo zahrievací stolík

NÁVOD NA POUŽITIE

Časť súpravy Vít Kit-Thaw (na jednu aplikáciu)

- 250 µl roztoku Thawing Solution-TS
- 50 µl roztoku Dilution Solution-DS
- 100 µl roztoku Washing Solution-WS

PROTOKOL ZAHRIEVANIA

(PRE OOCYTY A EMBRYÁ):

POZNÁMKA: Zahrievacie kroky zahŕňajú ponorenie zariadenia do roztoku TS pri teplote 37 °C a následné riedenie a premývanie v roztokoch DS a WS pri izbovej teplote.

1. Pripravte zahrievacie misky (ako je ukázané na diagrame so zariadením HSV):
 - Pri teplote 37 °C: Asepticky nadávajte 250 µl roztoku TS do sterilnej 4-jamkovej misky alebo orgánovej kultivačnej misky a vložte ju do inkubátora pri teplote 37 °C bez CO₂ alebo na zahrievací stolík najmenej na 30 minút pred zahrievacím postupom.
2. POZNÁMKA: Pre oocyty nadávajte minimálne 1 ml roztoku TS
2. Identifikujte slamky HSV Straw na zahriatie z úschovne LN₂ a rýchlo ich preneste do zásobníka naplneného LN₂ na prípravu na rozmrazovací postup.
3. Zásobník LN₂ umiestnite do blízkosti mikroskopu na následnú rýchlu manipuláciu.
4. Misku s TS vyberte z inkubátora teploty 37 °C alebo zahrievacieho stolíka a položte ju pod zaostrenie mikroskopu na vrchu stolíka mikroskopu.
5. Nadvihnite slamku natoľko, aby sa obnažila farebná manipulačná tyčinka. Dajte pozor, aby koniec so vzorkou zostal ponorený do LN₂.
6. Pomocou klieští (alebo iného zariadenia na strihanie drôtov) odstrihnite slamku vo výške farebnej manipulačnej tyčinky. Červená strihacia značka na kliešťoch by mala byť umiestnená do maximálnej polohy alebo odstránená.
 - Pripadne prstami a palcom otáčajte slamku, pričom nožnicami robte strihacie pohyby 10 mm pod vrchom farebnej manipulačnej tyčinky.
7. Jedným ráznym, no kontrolovaným pohybom rýchlo zachyťte manipulačnú tyčinku a vytiahnite ju zo slamky.
8. Okamžite kanálik ponorte do 37 °C roztoku TS a jemným vírením oddelíte vzorky od zariadenia a nechajte postáť 1 minútu.

Kroky 9 – 12 sa musia vykonávať pri izbovej teplote (22 °C – 27 °C).

- Pri izbovej teplote: Asepticky nadávajte jednu (1) 50 µl kvapku roztoku DS na sterilnú Petriho misku
9. Natiahnite trochu roztoku DS do prenosovej pipety a preneste vzorky z kvapky roztoku TS s minimálnym objemom do kvapky roztoku DS na 4 minúty.

POZNÁMKA: Počas expozície roztoku DS zostane vzorka scvrknutá.

POČAS TEJTO DOBY PRIPRAVTE DVE 50 µl KVAPKY ROZTOKU WS (WS1, WS2) TAK, AKO JE UKÁZANÉ NA DIAGRAME SO ZARIADENÍM HSV.

10. Preneste vzorky do kvapky roztoku WS (WS1) na 4 minúty.
- POZNÁMKA: Vzorky by sa mali znovu rozliahnúť na pôvodnú veľkosť do 2 – 3 minút v roztoku WS.
11. Potom preneste vzorky do druhej kvapky roztoku WS (WS2) na 4 minúty.
12. Zahriate OOCYTY preneste do vopred ustáleného kultivačného média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml na obnovu (2 – 3 hodiny, aby sa ponechal dostatok času na opätovné vytvorenie vretena) pred ďalšou manipuláciou.

Pre zahriatie EMBRYÁ existujú dve možnosti:

- a) Na okamžitý prenos do pacientky: EMBRYÁ preneste do vopred ustáleného „prenosového“ média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml.
- b) Na ďalšiu kultiváciu: EMBRYÁ preneste do vopred ustáleného kultivačného média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml na 4-hodinovú dobu obnovy. Po dobe obnovy EMBRYÁ preneste do kultivačného média s 10 % (v/v) bielkoviny a primerane inkubujte, kým sa nedosiahne požadované vývojové štádium na prenos do pacientky.

POZNÁMKA: Obnovené oocyty sa musia oplodniť postupom ICSI na optimálne oplodnenie po vitifikácii.

NA ZAHRIEVANIE POMŮCKY CRYOLOCK™ AKO NOSIČA:

VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Sterilná 4-jamková miska alebo sterilné malé Petriho misky (35 x 10 mm alebo ekvivalentné)
- Jednorazové rukavice
- Prenosové pipety
- Stopky alebo časomer
- Zásobník tekutého dusíka
- Tekutý dusík
- Kultivačné médium s bielkovinou, vopred ustálené na 37 °C v inkubátore s CO₂ pred rozmrazovacím postupom
- 37 °C inkubátor bez CO₂ alebo zahrievací stolík
- Peaň

NÁVOD NA POUŽITIE

Časť súpravy Vít Kit-Thaw (na jednu aplikáciu)

- 1 ml roztoku Thawing Solution-TS
- 50 µl roztoku Dilution Solution-DS
- 100 µl roztoku Washing Solution-WS

PROTOKOL ZAHRIEVANIA

POZNÁMKA: Zahrievacie kroky zahŕňajú ponorenie zariadenia do roztoku TS pri teplote 37 °C a následné riedenie a premývanie v roztokoch DS a WS pri izbovej teplote.

1. Pripravte si rozmrazovaciu misku (ako je ukázané na diagrame s Cryolock, obrázok 1):
 - Pri teplote 37 °C: Asepticky nadávajte minimálny objem 1 ml roztoku TS a zahrejte ho na teplotu 37 °C v inkubátore bez CO₂ alebo na zahrievacom stolíku najmenej 30 minút pred začiatkom zahrievacieho postupu.
2. Identifikujte vzorky Cryolock, ktoré sa idú zahrievať, a rýchlo ich preneste z úschovne LN₂ do skladovacieho zásobníka naplneného LN₂ na prípravu na zahrievací postup.
3. Skladovací zásobník naplnený LN₂ umiestnite do blízkosti pracovnej oblasti a stolíka mikroskopu na dosiahnutie následnej rýchlej manipulácie zo zásobníka do roztoku TS.

4. Misku s TS vyberte z inkubátora teploty 37 °C alebo zahrievacieho stolíka a položte ju pod zaostrenie mikroskopu na vrchu stolíka mikroskopu.
 5. Peánom podržte horný koniec tela Cryolock s identifikačným označením smerom nahor.
Možnosť A: Rýchlo, no jemne odstráňte vrchnák pod LN₂, otáčaním častí, kým sa neuvoľní.
Možnosť B: Rýchlo vyberte Cryolock z LN₂, potom rýchlo odstráňte vrchnák jemným otočením.
- POZNÁMKA:** Laboratórium by malo postupovať podľa svojich vlastných postupov a protokolov. Možnosť A nie je schválená na použitie v USA.
6. Konkávnú špičku pomôcky Cryolock so vzorkami smerom nahor okamžite ponorte do 37 °C roztoku TS. Pod mikroskopickým pozorovaním jemne hýbte pomôckou Cryolock, kým sa vzorka neuvoľní zo špičky.
 7. Vzorky ponechajte v roztoku TS na celkom 1 minútu.
 8. Tridsať (30) sekúnd po úvodnom ponorení vzorky jemne pipetujte, ak plávajú, a posuňte ich na dno roztoku TS.

Kroky 9 – 12 sa musia vykonávať pri izbovej teplote (22 °C – 27 °C).

- Pri izbovej teplote: Asepticky nadávkujte jednu (1) 50 µl kvapku roztoku DS na sterilnú Petriho misku (pozri diagram s Cryolock, obrázok 2)

9. Vzorky preneste do roztoku DS do 4 minút. Vzorky jemne raz pipetujte, aby sa zaistilo kompletne opláchnutie v roztoku DS.
- POZNÁMKA:** Počas expozície roztoku DS zostane vzorka scvrknutá.
10. Počas 4-minútovej expozície v roztoku DS asepticky nadávkujte dve (2) 50 µl kvapky roztoku WS (WS1, WS2), ako je ukázané na diagrame.
 11. Vzorky preneste do roztoku WS1 a potom WS2, každý na 4 minúty, bez rušenia.
- POZNÁMKA:** Vzorky by sa mali znovu rozliahnuť na pôvodnú veľkosť do 2 – 3 minút v roztoku WS.
12. Zahriate OOCYTY preneste do vopred ustáleného kultivačného média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml na obnovu (2 – 3 hodiny, aby sa ponechal dostatok času na opätovné vytvorenie vretena) pred ďalšou manipuláciou.

Pre zahriate EMBRYÁ existujú dve možnosti:

- a) Na okamžitý prenos do pacientky: EMBRYÁ preneste do vopred ustáleného „prenosového“ média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml.
- b) Na ďalšiu kultiváciu: EMBRYÁ preneste do vopred ustáleného kultivačného média s 20 % (v/v) bielkovinového doplnku alebo 12 mg/ml na 4-hodinovú dobu obnovy. Po dobe obnovy EMBRYÁ preneste do kultivačného média s 10 % (v/v) bielkoviny a primerane inkubujte, kým sa nedosiahne požadované vývojové štádium na prenos do pacientky.

Ďalšie podrobnosti o použití týchto produktov by malo každé laboratórium čerpať zo svojich vlastných laboratórnych postupov a protokolov, ktoré boli špecificky vypracované a optimalizované pre váš individuálny medicínsky program.

POKyny PRE UCHOVÁVANIE A STABILITU

Neotvorené skúmavky uchovávajte v chladničke pri teplote 2 °C až 8 °C. Pri odporúčanom skladovaní budú roztoky súpravy Vitrification Thaw Kit stabilné až do dátumu expirácie vytlačeného na označení skúmavky.

Médiá nepoužívajte dlhšie než osem (8) týždňov po otvorení nádob.

Pretože v produkte je prítomný materiál z ľudských zdrojov, počas uchovávania sa môžu vytvoriť určité tuhé častice. O týchto tuhých časticích nie je známe, že by mali vplyv na výkon produktu.

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA

Táto pomôcka je určená na výhradné použitie personálom vyskoleným na postupy asistovanej reprodukcie. Tieto postupy zahŕňajú určené použitie, na ktoré je táto pomôcka určená.

Pracovisko používateľa tejto pomôcky zodpovedá za udržiavanie sledovateľnosti tohto produktu a musí v potrebných prípadoch spĺňať národné predpisy týkajúce sa sledovateľnosti.

Nepoužívajte žiadnu skúmavku s roztokom, v ktorom sa javia známky poškodenia, úniku, tuhých častíc, zákalu alebo zmenil farbu. Produkt likvidujte v súlade s príslušnými predpismi.

Aby nevznikli problémy s kontamináciou, vždy so zariadením manipulujte s použitím aseptických techník.

Podľa súčasnej výskumnej literatúry sú dlhodobé účinky vitrifikácie na oocyty a embryá stále neznáme.

Nepoužívajte žiadnu fľašu, ktorej sterilný obal bol narušený.

EÚ: Štandardné opatrenia na prevenciu infekcií v dôsledku použitia medicínskych produktov pripravených z ľudskej krvi alebo plazmy zahŕňajú výber darcov, skríning jednotlivých odberov a zdrojov plazmy na špecifické markery infekcií a zahŕňajú účinné výrobné kroky na inaktiváciu/odstránenie vírusov. Napriek tomu, keď sa podávajú medicínske produkty pripravené z ľudskej plazmy alebo krvi, nemožno úplne vylúčiť možnosť prenosu infekčných látok. Platí to aj pre neznáme alebo vyvíjajúce sa vírusy a iné patogény. Neboli hlásené žiadne dokázané prenosy vírusov s albumínom vyrobených podľa špecifikácií európskeho liekopisu pomocou zavedených postupov. Zakaždým, keď sa pacientke podávajú kultivačné médiá produktov reprodukčných médií spoločnosti Irvine Scientific, LLC, sa zaznamená názov a číslo šarže produktu, aby sa zachovalo prepojenie medzi pacientkou a šaržou produktu.

USA: Tento produkt obsahuje ľudský sérový albumín (HSA). Materiál z ľudského zdroja, použitý na prípravu tohto produktu, bol testovaný pomocou súprav licencovaných agentúrou FDA a bolo zistené, že nie je reaktívny na protilátky proti vírusu hepatitídy C (HCV) a protilátky proti vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV). Žiadna testovacia metóda však nemôže úplne zaručiť, že produkty odvodené z ľudských zdrojov nie sú infekčné. So všetkými materiálmi z ľudských zdrojov zaobchádzajte, ako keby boli schopné prenosu infekcie, s použitím všeobecných bezpečnostných opatrení. Darcovia zdrojového materiálu tiež podstúpili skríning na CJD.

KONTRAINDIKÁCIE

Tento produkt obsahuje gentamicínsulfát. Musia sa vykonať primerané bezpečnostné opatrenia aby sa zaistilo, že pacientka nie je senzibilizovaná na toto antibiotikum.

БЪЛГАРСКИ

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ЗА ЕС: Само за професионална употреба.

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Vit Kit-Thaw (витрификационен комплект за размразяване) е предназначен за употреба при размразяване на витрифицирани яйцеклетки (MI), пронуكلеарни (PN) зиготи, до ембриони в ден 3 на стадия на делене и ембриони в стадия на бластоцист, които са били витрифицирани с помощта на витрификационния комплект за замразяване (каталожен № 90133-SO).

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

Thawing Solution-TS е буферен разтвор с HEPES на Medium-199, съдържащ гентамицин сулфат, 1,0 М сукроза и 20% (v/v) серумен суплемент с декстран (DSS).

Dilution Solution-DS е буферен разтвор с HEPES на Medium-199, съдържащ гентамицин сулфат, 0,5 М сукроза и 20% (v/v) DSS.

Washing Solution-WS е буферен разтвор с HEPES на Medium-199, съдържащ гентамицин сулфат и 20% (v/v) DSS.

DSS е протеинов суплемент, състоящ се от 50 mg/mL терапевтичен клас човешки серумен албумин (HSA) и 20 mg/mL декстран. DSS се използва при 20% (v/v) във Vit Kit-Thaw за окончателна концентрация от 10 mg/mL HSA и 4 mg/mL декстран.

Тези три разтвора трябва да се използват последователно в съответствие с протокола за поэтапно микроапно затопляне.

СЪСТАВ

<u>Соли и йони</u>	<u>Амид на никотинова</u>	<u>Източник на протеин</u>	<u>Пролин</u>	<u>Други</u>
Натриев хлорид	киселина	Човешки серумен	Тирозин	Гуанин
Натриев фосфат	Пантотенова киселина	албумин	Аланин	Хипоксантин
Калиев хлорид	Рибофлавин	<u>Буфери</u>	Аспаргинова киселина	Тимин
Магнезиев сулфат	Пиридоксин	Сода бикарбонат	Глутаминова киселина	Урацил
Натриев ацетат	Тиамин	HEPES	Изолевцин	Ксантин
Калциев хлорид	Биотин	<u>Индикатор за рН</u>	Левцин	Аденозин
Железен нитрат	Алфа-токоферол	Червен фенол	Метионин	Аденин сулфат
Холин хлорид	Натриев бисулфит	<u>Макромоллекули</u>	Фенилаланин	Дезоксирибоза
<u>Витамици и минерали</u>	<u>Антиоксидант</u>	Сукроза	Серин	Рибоза
Аскорбинова киселина	Глутатион	Декстран	Треонин	<u>Вода</u>
Аминобензоена	<u>Антибиотик</u>	<u>Аминокиселини</u>	Триптофан	WFI качество
киселина	Гентамицин сулфат	Аргинин	Валин	
Калциферол	<u>Енергийни субстрати</u>	Глицин	Цистеин	
Фолиева киселина	Глюкоза	Хистидин	Хидроксиполин	
Никотинова киселина	Инозитол	Лизин	Цистин	

ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО

Разтворите във Vit Kit-Thaw са мембранно филтрирани и асептично обработени съгласно валидираните производствените процедури.

Всяка партида Vit Kit-Thaw преминава през следните изпитвания:

Разтвори:

- Ендотоксин по метода на Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)
- Анализ на ембриони на мишки (една клетка) ($\geq 80\%$ разширен бластоцист)
- Стерилитет чрез настоящия тест за стерилитет USP <71> (валиден)

Всички резултати се отчитат в сертификат за анализ за конкретната партида, който се предоставя при поискване.

ЗА CRYOTIP ЗА ЗАТОПЛЯНЕ КАТО НОСИТЕЛ:

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ВКЛЮЧЕНИ

- Конектор (каталожен № 40736) или адаптер
- Стерилни петриеве блюда (50 X 9 mm, Falcon 351006 или еквивалентни)
- Ръкавици за еднократна употреба
- Спринцовка Hamilton GASTIGHT® (50 μ L), каталожен № 80901
- Трансфериращи пипети (пипети със стъкло бутало или микропипетни върхове с вътрешен диаметър на върха ~ 200 μ m)
- Пинцети
- Хронометър или таймер
- Резервоар за течен азот (Дюаров съд или стиропорен контейнер с капак с обем 1-2 L)
- Течен азот (в достатъчно количество, за да достигне 4 инча (10 cm) дълбочина в резервоара)
- Остри ножици (стерилни)
- Водна баня на 37° C
- Среда за култивиране с протеин, предварително уравновесена до 37° C в инкубатор с CO₂ преди процедурата за размразяване.
- Инкубатор на 37° C, без CO₂ или стойка с нагряване.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Компоненти на Vit Kit-Thaw (за всяко приложение):

- 50 μ L Thawing Solution-TS
- 50 μ L Dilution Solution-DS
- 100 μ L Washing Solution-WS
- 1 конектор.

ПРОТОКОЛ ЗА ЗАТОПЛЯНЕ

(ЗА ЯЙЦЕКЛЕТКИ И ЕМБРИОНИ):

ЗАБЕЛЕЖКА: Процедурите трябва да се извършват при стайна температура (20 – 27° C). НЕ използвайте стойка на микроскоп с нагряване за следните процедури.

ВНИМАНИЕ: По време на манипулациите в разтвори за размразяване сведете до минимум излагането на спесимена на светлина.

1. Затоплете количеството TS, DS и WS, което ще използвате, до стайна температура (20 – 27° C) преди затопляне на витрифицираните спесимени.
ЗАБЕЛЕЖКА: Когато всеки път се налага да използвате малко количество от разтвора, избягвайте да затопляте целите епруветки с TS, DS и WS непрекъснато до стайна температура. По-добре е да отделите количеството, което ще се използва, и да върнете епруветките на температура 2 – 8° C веднага след отделението.
2. Напълнете предназначения за това резервоар с течен азот (~80% от обема му) и го поставете близо до камерата с LN₂, съдържаща спесимените, които ще бъдат размразявани.
3. Извадете пръчките с бокалите, съдържащи CryoTip с витрифицираните спесимени, от отделението с течен азот и ги прехвърлете в пълния с течен азот резервоар.
ВНИМАНИЕ: Уверете се, че CryoTip остават потопени в LN₂ (в бокал) по време на прехвърлянето от отделението в резервоара с LN₂, за да предотвратите неконтролирано размразяване на спесимените.
Поставете резервоара близо до микроскопа за бърза манипулация.
4. Поставете етикет с необходимата информация на стерилно петриево блюдо (или капак).
5. Внимателно обърнете всяка епруветка с TS, DS и WS два пъти, за да смесите съдържанието преди употреба.
6. Подгответе блюдото с капки от разтворите за протокола за затопляне, както следва:
Капнете асептично 2 микрокапки върху обърнат капак на стерилно петриево блюдо, както е показано на Фигура 1, и поставете блюдото на стойката на микроскопа:
 - една капка 50 µl TS
 - една капка 50 µl DS
 - (две капки WS ще се използват по-късно, в стъпка 11).
7. Поставете водната баня на 37° C близо до микроскопа. Уверете се, че наблизо разполагате със следното: трансферираща пипета и върхове, стерилни остри ножици, спринцовка Hamilton и стерилни кърпички.
8. С помощта на пинцети (или клещи) извадете конкретния CryoTip от CryoCane в течен азот, бързо потопете CryoTip във водната баня на 37° C (≥ 500 ml) и внимателно раздвижете за 3 секунди, за да го затоплите (вж. Фигура 2) при + 24 000° C/min.
9. Бързо извадете съдържанието на CryoTip, както следва (вж. Фигура 3):
 - Бързо избършете CryoTip със стерилна кърпичка.
 - Свалете ръкава на металния капак.
 - Срежете уплътнението на широкия край на CryoTip, при маркировка № 4.
 - Прикрепете широкия край на CryoTip здраво към спринцовка Hamilton или подходящ аспирационен инструмент с помощта на конектор или адаптер.
ЗАБЕЛЕЖКА: Повдигнете буталото на спринцовката на около 0,5 инча (1,3 cm), преди да я прикрепите към конектора и CryoTip.
 - Внимателно избършете финия връх със стерилна кърпичка.
 - Когато CryoTip е поставен над подготвеното блюдо за размразяване, бързо срежете уплътнението на маркировка № 2 на финия край на върха и капнете съдържанието на CryoTip като малка капка (~1 µl) върху суха зона на блюдото над капката TS (вж. Фигура 4).
ЗАБЕЛЕЖКА: ИЗБЯГВАЙТЕ ОБРАЗУВАНЕ НА МЕХУРЧЕТА ПРИ ИЗВАЖДАНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО.
10. Смесете капката TS със съдържанието на CryoTip и изчакайте 1 минута, за да се даде възможност за постепенно смесване (вж. Фигура 4).
ЗАБЕЛЕЖКА: Спесимените ще се свият и ще изплуват на повърхността на капката.
ЗАБЕЛЕЖКА: След всяко прехвърляне на спесимен/спесимени, премахнете оставащата течност в трансфериращата пипета и изтеглете малко разтвор от следващата капка преди следващата манипулация. Избягвайте образуването на мехурчета по време на прехвърлянията.
11. Изтеглете малко DS в трансфериращата пипета и прехвърлете спесимена/спесимените от капката TS с минимално количество в капката DS за 4 минути.
ЗАБЕЛЕЖКА: Спесименът ще остане свит, докато е изложен на DS.
ПРЕЗ ТОВА ВРЕМЕ ПОДГОТВЕТЕ ДВЕ КАПКИ 50 µl WS (WS1, WS2), КАКТО Е ПОКАЗАНО НА ФИГУРА 4.
12. Прехвърлете спесимена/спесимените в капката WS (WS1) за 4 минути.
ЗАБЕЛЕЖКА: Спесименът/спесимените трябва да се уголеми/уголемят отново до първоначалния размер за 2 – 3 минути във WS.
13. След това прехвърлете спесимена/спесимените във втората капка WS (WS2) за 4 минути.
14. Прехвърлете затоплената/затоплените ЯЙЦЕКЛЕТКА/ЯЙЦЕКЛЕТКИ в предварително еквилибрирана среда за култивиране с 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент за възстановяване (необходими са 2 – 3 часа за повторно формиране на вретено) преди последващи манипулации.
За затопления/затоплените ЕМБРИОН/ЕМБРИОНИ има две опции:
 - a) За незабавно прехвърляне в пациент: прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в предварително еквилибрирана „трансферираща“ среда, съдържаща 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент.
 - b) За по-нататъшно култивиране: прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в предварително уравновесена среда за култивиране, съдържаща 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент за 4-часов период за възстановяване. След периода за възстановяване прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в среда за култивиране с 10% (v/v) протеин и съответно инкубирайте, докато бъде достигнат желаният стадий на развитие за прехвърляне в пациент.

ЗА ЗАТОПЛЯНЕ НА ИЗДЕЛИЕ NSV ЗА КАТО НОСИТЕЛ:

НЕОБХОДИМ МАТЕРИАЛ, КОЙТО НЕ Е ВКЛЮЧЕН

- Стерилно 4-мякво блюдо (Nunc 179830, 144444 или еквивалентно) или блюдо за култивиране на органи (BD Falcon 353037)
- Ръкавици за еднократна употреба
- Трансфериращи пипети
- Пинцети
- Хронометър или таймер
- Резервоар за течен азот
- Течен азот
- Ножици, клещи Knipex или друго изделие за рязане на тел
- Среда за култивиране с протеин, предварително уравновесена до 37° C в инкубатор с CO₂ преди процедурата за размразяване
- Инкубатор на 37° C, без CO₂ или стойка с нагряване.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Компоненти на Vit Kit-Thaw (за всяко приложение):

- 250 µl Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS.

ПРОТОКОЛ ЗА ЗАТОПЛЯНЕ

(ЗА ЯЙЦЕКЛЕТКИ И ЕМБРИОНИ):

ЗАБЕЛЕЖКА: Стъпките за затопляне включват потапяне на изделието в TS на 37° C и последващо разреждане и промиване в DS и WS на стайна температура.

1. Подгответе блюдата за затопляне (както е показано на диаграмата на изделието HSV):

- На 37° C: Капнете асептично капки 250 µl TS в стерилно 4-мяково блюдо или блюдо за култивиране на органи и го поставете в инкубатор на 37° C без CO₂ или на стойка с нагряване най-малко 30 минути преди процедурата за затопляне.

ЗАБЕЛЕЖКА: За яйцеклетки, капнете най-малко 1 ml TS.

2. Изберете кои HSV тръбички от отделението с LN₂ ще бъдат затоплени и бързо ги прехвърлете в пълен с LN₂ резервоар за подготвяне за процедура за размразяване.

3. Поставете резервоара с LN₂ близо до микроскопа за последваща бърза манипулация.

4. Извадете блюдото с TS от инкубатора на 37° C и внимателно го раздвижете, за да откатите спесиментите от изделието, и го оставете за 1 минута.

5. Повдигнете тръбичката достатъчно, че да се открие оцветения манипулационен прът. Уверете се, че краят със спесимена/спесиментите остава потопен в LN₂.

6. Използвайте клещи Кнпрех (или друго изделие за рязане на тел), за да отрежете тръбичката на височината на оцветения манипулационен прът. Червеният водач за дължина на рязане на клещите Кнпрех трябва да бъде поставен в положение за максимална дължина или да бъде премахнат.

- Като алтернатива използвайте пръстите и палеца си, за да въртите тръбичката, докато извършвате движенията за рязане с ножици, на 10 mm под горната част на оцветения манипулационен прът.

7. С бързо, но контролирано движение бързо стиснете манипулационния прът и го извадете от тръбичката.

8. Незабавно потопете улея в TS на 37° C и внимателно го раздвижете, за да откатите спесиментите от изделието, и го оставете за 1 минута.

Стъпки 9 – 12 трябва да се извършват на стайна температура (22 – 27° C).

- На стайна температура: Капнете асептично една (1) капка 50 µl DS върху стерилно петриево блюдо.

9. Изтеглете малко DS в трансфериращата пипета и прехвърлете спесимена/спесиментите от капката TS с минимално количество в капката DS за 4 минути.

ЗАБЕЛЕЖКА: Спесиментът ще остане свит, докато е изложен на DS.

ПРЕЗ ТОВА ВРЕМЕ ПОДГОТВЕТЕ ДВЕ КАПКИ 50 µl WS (WS1, WS2), КАКТО Е ПОКАЗАНО НА ДИАГРАМАТА НА ИЗДЕЛИЕТО HSV.

10. Прехвърлете спесимена/спесиментите в капката WS (WS1) за 4 минути.

11. След това прехвърлете спесимена/спесиментите във втората капка WS (WS2) за 4 минути.

12. Прехвърлете затоплената/затоплените ЯЙЦЕКЛЕТКА/ЯЙЦЕКЛЕТКИ в предварително еквилибрирана среда за култивиране с 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент за възстановяване (необходими са 2 – 3 часа за повторно формиране на вретено) преди последващи манипулации.

За затопления/затоплените ЕМБРИОН/ЕМБРИОНИ има две опции:

- a) За незабавно прехвърляне в пациент: прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в предварително еквилибрирана „трансферираща“ среда, съдържаща 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент.

- b) За по-нататъшно култивиране: прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в предварително уравновесена среда за култивиране, съдържаща 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент за 4-часов период за възстановяване. След периода за възстановяване прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в среда за култивиране с 10% (v/v) протеин и съответно инкубирайте, докато бъде достигнат желаният стадий на развитие за прехвърляне в пациент.

ЗАБЕЛЕЖКА: Възстановените яйцеклетки трябва да бъдат оплодени с помощта на ICSI за оптимално оплождане след витрифициране.

ЗА CRYOLOCK™ ЗА ЗАТОПЛЯНЕ КАТО НОСИТЕЛ:

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ВКЛЮЧЕНИ

- Стерилно 4-мяково блюдо или стерилни малки петриеви блюда (35 X 10 mm или еквивалентни)
- Ръкавици за еднократна употреба
- Трансфериращи пипети
- Хронометър или таймер
- Резервоар за течен азот
- Течен азот
- Среда за култивиране с протеин, предварително уравновесена до 37° C в инкубатор с CO₂ преди процедурата за размразяване
- Инкубатор на 37° C, без CO₂ или стойка с нагряване
- Форцепс.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Компоненти на Vit Kit-Thaw (за всяко приложение):

- 1 ml Thawing Solution-TS
- 50 µl Dilution Solution-DS
- 100 µl Washing Solution-WS.

ПРОТОКОЛ ЗА ЗАТОПЛЯНЕ

ЗАБЕЛЕЖКА: Стъпките за затопляне включват потапяне на изделието в TS на 37° C и последващо разреждане и промиване в DS и WS на стайна температура

1. Подгответе блюдо за размразяване (както е показано на диаграмата на Cryolock, Фигура 1):

- На 37° C: Капнете асептично минимално количество от 1 ml TS и затоплете до 37° C в инкубатор без CO₂ или на стойка с нагряване най-малко 30 минути преди започване на процедурата за затопляне.

2. Изберете кои проби в Cryolock ще бъдат затоплени и бързо ги прехвърлете от отделението с LN₂ в пълен с LN₂ резервоар за подготвяне за процедура за размразяване.

3. Поставете пълния с LN, резервоар за съхранение в непосредствена близост до зоната на работа и стойката на микроскопа, за да се позволи последваща бърза манипулация от резервоара в TS.
4. Извадете блюдото с TS от инкубатора на 37° C или стойката за нагряване и го поставете на фокус в горната част на стойката на микроскопа.
5. С помощта на форцепс задръжте горния край на корпуса на Cryolock, с идентификационния етикет нагоре.
Опция А: Бързо, но внимателно махнете капачката под LN₂, като въртите частите, докато ги освободите.
Опция В: Бързо извадете Cryolock от LN₂, а след това бързо махнете капачката с леко завъртане.

ЗАБЕЛЕЖКА: Лабораторията трябва да се консултира със собствените си процедури и протоколи. Опция А не е разрешена за използване в САЩ.

6. Незабавно потопете вдлъбнатия връх на Cryolock, със спесимена/спесимените, насочен/насочени нагоре, в TS на 37° C. Докато наблюдавате под микроскоп, внимателно преместете Cryolock, докато спесименът/спесимените бъде/бъдат освободени от върха.
7. Оставете спесимена/спесимените за общо 1 минута в TS.
8. 30 (тридесет) секунди след първоначалното потапяне внимателно пипетирайте спесимена/спесимените, ако изплува/изплуват, и го ги поставете на дъното на TS.

Стъпки 9 – 12 трябва да се извършват на стайна температура (22 – 27° C).

- На стайна температура: Капнете асептично една (1) капка 50 µL DS върху стерилно петричево блюдо (вж. диаграмата на Cryolock, Фигура 2).

9. Прехвърлете спесимена/спесимените в DS за 4 минути. Внимателно пипетирайте спесимените един път, за да гарантирате, че са напълно потопени в DS.

ЗАБЕЛЕЖКА: Спесименът ще остане свит, докато е изложен на DS.

10. По време на 4-минутното излагане на DS капнете асептично 2 (две) капки 50 µL WS (WS1, WS2), както е показано на диаграмата.
11. Прехвърлете спесимена/спесимените в WS1 и след това в WS2, всеки път за 4 минути без прекъсване.

ЗАБЕЛЕЖКА: Спесименът/спесимените трябва да се уголеми/уголемят отново до първоначалния размер за 2 – 3 минути във WS.

12. Прехвърлете затоплената/затоплените ЯЙЦЕКЛЕТКА/ЯЙЦЕКЛЕТКИ в предварително еквилибрирана среда за култивиране с 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент за възстановяване (необходими са 2 – 3 часа за повторно формиране на вретено) преди последващи манипулации.

За затопления/затоплените ЕМБРИОН/ЕМБРИОНИ има две опции:

- a) За незабавно прехвърляне в пациент: прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в предварително уравновесена „трансферираща“ среда, съдържаща 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент.
- b) За по-нататъшно култивиране: прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в предварително уравновесена среда за култивиране, съдържаща 20% (v/v) или 12 mg/ml протеинов суплемент за 4-часов период за възстановяване. След периода за възстановяване прехвърлете ЕМБРИОНА/ЕМБРИОНИТЕ в среда за култивиране с 10% (v/v) протеин и съответно инкубирайте, докато бъде достигнат желаният стадий на развитие за прехвърляне в пациент.

За допълнителни подробности относно употребата на тези продукти всяка лаборатория трябва да се консултира със своите собствени процедури и протоколи, които са специално разработени и оптимизирани за Вашата индивидуална медицинска програма.

ИНСТРУКЦИИ ЗА СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

Съхранявайте неотворените епруветки в хладилник при 2° C до 8° C. Когато се съхраняват според инструкциите, разтворите на витрификационния комплект за размразяване са стабилни до изтичане на срока им на годност, посочен на етикетите на епруветките.

Не използвайте изделието повече от 8 (осем) седмици след отваряне на контейнерите.

Тъй като в продукта има налични материали от човешки източник, в него може да се развият някои частици по време на съхранение. Не е установено дали този тип частици влияе върху действието на продукта.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Това изделие е предназначено за употреба от персонал, обучен в процедурите за асистирано възпроизводство. Тези процедури включват предвиденото приложение, за което това е изделие е предназначено.

Учреждението на потребителя на това изделие носи отговорност за поддържане на проследяемостта на продукта и трябва да спазва националните разпоредби относно проследяемостта, когато е приложимо.

Не използвайте епруветка с разтвор, при която има ясни признаци на повреда, теч, частици, замъгляване или променен цвят. Изхвърлете продукта съгласно приложените разпоредби.

За да избегнете проблеми със замърсяване, използвайте асептични техники.

В момента научната литература посочва, че дългосрочните ефекти от витрификация на яйцеклетки и ембриони все още не са известни.

Не използвайте бутилки с нарушена стерилна опаковка.

ЕС: Стандартните мерки за предотвратяване на инфекции, произтичащи от употребата на лекарствени продукти, приготвени от човешка кръв или плазма, включват избор на донори, скрининг на индивидуално даряване и резервоари с плазма за специфични маркери за инфекция, както и включване на ефективни производствени стъпки за деактивиране/премахване на вируси. Въпреки това, когато се прилагат лекарствени продукти, приготвени от човешка кръв или плазма, не може напълно да се изключи възможността от предаване на причинители на инфекции. Това важи също така и за непознати или нововъзникващи вируси и други патогени. Няма данни за доказано предаване на вируси с албумин, произведен по спецификациите на Европейската фармакопея и според установените процеси. Настоятелно се препоръчва при всяко прилагане на продуктите с репродуктивни средства Irvine Scientific, LLC върху пациент да се записват наименованието и номера на партидата на продукта, за да се поддържа връзка между пациента и партидата.

САЩ: Този продукт съдържа човешки серумен албумин (HSA). Материалите от човешки източник, използвани при производството на този продукт, са изследвани с комплекти, лицензирани от Агенцията за контрол на храните и лекарствата, и не е установено да са реактивни на антителата срещу хепатит С (HCV) антителата срещу човешки имунодефицитен вирус (HIV). Въпреки това нито един метод на изследване не дава пълна гаранция, че продуктите с човешки произход не причиняват инфекции. Работете с всички продукти от човешки източник така, като че ли са способни да предадат инфекция и използвайте универсални предпазни мерки. Освен това донорите на изходните материали се изследват за болест на Кройцфелд-Якоб (CJD).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Продуктът съдържа гентамицин сулфат. Трябва да се вземат подходящи предпазни мерки, за да се гарантира, че пациентът не е чувствителен към антибиотици.

UPOZORENJE ZA EU: Samo za profesionalnu uporabu.

INDIKACIJA ZA UPOTREBU

Komplet Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) namijenjen je za odmrzavanje vitrificiranih oocita (MI) i zigota u pronuklearnom (PN) stadiju sve do embrija u stadiju diobe 3. dana i embrija u stadiju blastociste koji su vitrificirani kompletom Vitrification Freeze Kit (katalogski br. 90133-SO).

OPIS PROIZVODA

Thawing Solution-TS otopina je puferirana HEPES-om formule Medium-199 koja sadrži gentamicin sulfat, 1,0 M saharoze i 20 % (v/v) proizvoda Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS otopina je puferirana HEPES-om formule Medium-199 koja sadrži gentamicin sulfat, 0,5 M saharoze i 20 % (v/v) proizvoda DSS.

Washing Solution-WS otopina je za ispiranje puferirana HEPES-om formule Medium-199 koja sadrži gentamicin sulfat i 20 % (v/v) proizvoda DSS.

DSS je proteinski dodatak koji se sastoji od 50 mg/ml humanog serumskog albumina (HSA) terapijske kvalitete i 20 mg/ml dekstrana. DSS se upotrebljava u koncentraciji od 20 % (v/v) u kompletu Vit Kit-Thaw, čime se postiže ukupna konačna koncentracija od 10 mg/ml HSA i 4 mg/ml dekstrana.

Ove se tri otopine moraju upotrebljavati sekvencijalno prema postepenom protokolu zagrijavanja za mikrokapi.

SASTAV

<u>Soli i ioni</u>	Nikotinamid	<u>Izvor proteina</u>	Histidin	Hidroksiprolin
Natrijev klorid	Pantotenska kiselina	Humani serumski	Lizin	Cistin
Natrijev fosfat	Riboflavin	albumin	Prolin	<u>Ostalo</u>
Kalijev klorid	Pyridoksin	<u>Puferi</u>	Tirozin	Gvanin
Magnezijev sulfat	Tiamin	Natrijev bikarbonat	Alanin	Hipoksantin
Natrijev acetat	Biotin	HEPES	Asparaginska kiselina	Timin
Kalcijev klorid	Alfa-tokoferol	<u>Pokazatelj pH</u>	Glutaminska kiselina	Uracil
Željezov nitrat	Natrijev bisulfid	Fenolno crvenilo	Izoleucin	Ksantin
Kolin klorid	<u>Antioksidansi</u>	<u>Makromolekule</u>	Leucin	Adenozin
<u>Vitaminski i minerali</u>	Glutacion	Saharaza	Metionin	Adenin sulfat
Askorbinska kiselina	<u>Antibiotik</u>	Dekstran	Fenilalanin	Deoksiriboza
Aminobenzojeva kiselina	Gentamicin sulfat	<u>Aminokiseline</u>	Serin	Riboza
Kalciferol	<u>Energetski supstrati</u>	Arginin	Treonin	<u>Voda</u>
Folna kiselina	Glukoza	Glicin	Triptofan	Voda kvalitete za
Nikotinska kiselina	Inozitol		Valin	injekcije
			Cistein	

OSIGURAVANJE KVALITETE

Otopine u kompletu Vit Kit-Thaw membranski su filtrirane i aseptički obrađene prema potvrđenim proizvodnim postupcima.

Svaka šarža kompleta Vit Kit-Thaw ispituje se sljedećim ispitivanjima:

Otopine:

Endotoksin prema metodologiji Limulus amebocitnog lizata (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Analiza mišjeg embrija (jedna stanica) (≥ 80 % proširena blastocista)

Sterilnost prema trenutnom testu sterilnosti Američke farmakopeje (USP) <71> (prolazan rezultat)

Svi se rezultati bilježe na potvrdi o analizi za specifičnu šaržu koja je dostupna na upit.

ZA ZAGRIJAVANJE SLAMKE CRYOTIP KAO NOSITELJA:

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU UKLJUČENI U OPSEG ISPORUKE

- Priključak (katalogski br. 40736) ili prilagodnik
- Sterilne Petrijeve zdjelice (50 x 9 mm, Falcon 351006 ili proizvod jednake kvalitete)
- Rukavice za jednokratnu uporabu
- Štrcaljka Hamilton GASTIGHT® (50 μ l), katalogski br. 80901
- Prijenosne pipete (pipete od izvučenog stakla ili vršci mikropipeta s unutarnjim promjerom vrška od ~200 μ m)
- Pinceta
- Štoperica ili brojač vremena
- Spremnik za tekući dušik (vakuumska boca ili stiroporni spremnik s poklopcem, volumen 1 – 2 l)
- Tekući dušik (dovoljan volumen da dubina u spremniku bude 10 cm (4 inča))
- Oštre škare (sterilne)
- Vodena kupka s temperaturom od 37 °C
- Kultivacijski medij s proteinom, prethodno ekvilibriran na 37 °C u inkubatoru s CO₂ prije odmrzavanja.
- Inkubator od 37 °C bez CO₂ ili stolica za zagrijavanje.

UPUTE ZA UPORABU

Komponente kompleta Vit Kit-Thaw (za svaku primjenu):

- 50 μ l otopine za odmrzavanje Thawing Solution-TS
- 50 μ l otopine za razrjeđivanje Dilution Solution-DS
- 100 μ l otopine za ispiranje Washing Solution-WS
- 1 priključak

PROTOKOL ZAGRIJAVANJA

(ZA OOCITE I EMBRIJE):

- NAPOMENA: Vršite postupke na sobnoj temperaturi (20 – 27 °C). NE upotrebljavajte zagrijani stolić mikroskopa za sljedeće postupke.
- OPREZ: Što manje izlažite uzorak svjetlosti tijekom manipulacija s pomoću otopina za odmrzavanje.
- Prije zagrijavanja vitrificiranih uzoraka zagrijte na sobnu temperaturu (20 – 27 °C) potrebnu količinu otopina TS, DS i WS.
 - NAPOMENA: Ne zagrijavajte cijele ampule otopina TS, DS i WS na sobnu temperaturu ako svaki put trebate samo malu količinu otopine. Bolje je odrediti alikvotne količine koje ćete upotrijebiti i odmah nakon toga vratiti ampule na 2 – 8 °C.
 - Napunite spremnik tekućeg dušika tekućim dušikom (do ~80 %) i položite ga u blizini zamrzivača s tekućim dušikom (LN₂) koji sadrži uzorke za odmrzavanje.
 - Uklonite aluminijske držače s čašicama koje sadrže slamke CryoTip s vitrificiranim uzorcima iz pohrane s tekućim dušikom i prenesite ih u spremnik napunjen tekućim dušikom.
 - OPREZ: Slamke CryoTip obavezno moraju ostati uronjene u LN₂ (u čašici) tijekom prijenosa iz pohrane u spremnik s tekućim dušikom (LN₂) da ne bi došlo do nekontroliranog odmrzavanja uzoraka.
 - Položite spremnik blizu mikroskopa da bi bila moguća brza manipulacija.
 - Zabilježite potrebne podatke na sterilnu Petrijevu zdjelicu (ili poklopac).
 - Prije upotrebe nježno dvaput preokrenite svaku ampulu otopine TS, DS i WS da biste promiješali sadržaj.
 - Pripremite zdjelicu s kapljicama otopina za protokol zagrijavanja kako slijedi:
Aseptički dodajte slijed od 2 mikrokapi na preokrenuti poklopac sterilne Petrijeve zdjelice kako je prikazano na slici 1. i položite zdjelicu na stolić mikroskopa:
 - jednu kap otopine TS od 50 µl
 - jednu kap otopine DS od 50 µl
 - (dvije kapi otopine WS bit će pripremljene kasnije u 11. koraku)
 - Položite vodenu kupku s temperaturom od 37 °C blizu mikroskopa. Imajte sljedeće pri ruci: prijenosnu pipetu i vrške, sterilne oštre škare, štrcaljku Hamilton i sterilne maramice.
 - Pincetom (ili kliještima) izvadite dotični CryoTip iz držača u tekućem dušiku, brzo uronite CryoTip u vodenu kupku od 37 °C (≥ 500 ml) i nježno miješajte 3 sekunde da se zagrije (pogledajte sliku 2.) pri +24.000 °C/min.
 - Brzo stavite sadržaj slamke CryoTip kako slijedi (pogledajte sliku 3.):
 - Brzo osušite CryoTip sterilnom maramicom.
 - Uklonite metalnu ovojniciu.
 - Prerežite ovojnicu na širokom kraju slamke CryoTip kod 4. oznake.
 - Čvrsto pričvrstite široki kraj slamke CryoTip na štrcaljku Hamilton ili odgovarajući alat za aspiraciju s pomoću priključka ili prilagodnika.NAPOMENA: Podignite klip štrcaljke otprilike 0,5 inča (1,3 cm) prije nego što štrcaljku pričvrstite na priključak i CryoTip.
 - Brzo osušite fini vršak sterilnom maramicom.
 - Dok je slamka CryoTip položena iznad pripremljene zdjelice za odmrzavanje, brzo prerežite 2. oznaku na kraju finog vrška i stavite sadržaj slamke CryoTip u obliku kapljice (~1 µl) na suho područje zdjelice iznad kapi otopine TS (pogledajte sliku 4.).
 - NAPOMENA: IZBJEGAVAJTE MJEHURICE DOK STAVLJATE SADRŽAJ.
 - Spojite kap otopine TS sa sadržajem slamke CryoTip i pustite da se postupno miješaju 1 minutu (pogledajte sliku 4.).
Napomena: uzorci će se smanjiti i otplutati na vrh kapi.
 - NAPOMENA: Nakon svakog prijenosa uzor(a)ka, otpuštite preostalu tekućinu u prijenosnoj pipeti i usišite malo otopine iz sljedeće kapi prije iduće manipulacije. Izbjegavajte nastanak mjehurića tijekom prijenosa.
 - Usišite malo otopine DS u prijenosnu pipetu i prenesite uzorak (uzorke) iz kapi otopine TS s minimalnim volumenom u kap otopine DS na 4 minute.
 - NAPOMENA: Uzorak će ostati smanjen dok je izložen otopini DS.
 - TIJEKOM TOGA RAZDOBLJA PRIPREMITE DVIJE KAPI OTOPINE WS OD 50 µl (WS1, WS2) KAKO JE PRIKAZANO NA SLICI 4.
 - Prenesite uzorak (uzorke) u kap otopine WS (WS1) na 4 minute.
 - NAPOMENA: Uzorak (uzorci) bi se trebao vratiti u prvotnu veličinu unutar 2 – 3 minute stajanja u otopini WS.
 - Zatim prenesite uzorak (uzorke) u drugu kap otopine WS (WS2) na 4 minute.
 - Prije daljnjih manipulacija prenesite zagrijani OOCIT(E) u prethodno ekvilibrirani kultivacijski medij s 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml da bi se oporavio (2 – 3 sata kako bi bilo dovoljno vremena za ponovno oblikovanje diobenog vretena).
 - Postoje dvije mogućnosti za zagrijani EMBRIO (EMBRIJE):
 - Ako se odmah prenosi u pacijenticu: prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u unaprijed ekvilibrirani medij za prijenos koji sadrži 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml.
 - Ako se dalje kultivira: prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u unaprijed ekvilibrirani kultivacijski medij koji sadrži 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml na 4 sata kako bi se oporavio. Nakon razdoblja oporavka prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u kultivacijski medij s 10 % (v/v) proteina i inkubirajte na odgovarajući način dok embrio ne dostigne željeni stadij razvoja za prijenos u pacijenticu.

ZA ZAGRIJAVANJE UREĐAJA HSV KAO NOSITELJA:

POTREBNI MATERIJAL KOJI NIJE UKLJUČEN U OPSEG ISPORUKE

- Sterilna zdjelica s 4 jačice (Nunc 179830, 144444 ili proizvod jednake kvalitete) ili zdjelica za kultivaciju organa (BD Falcon 353037)
- Rukavice za jednokratnu uporabu
- Prijenosne pipete
- Pinceta
- Štoperica ili brojač vremena
- Spremnik tekućeg dušika
- Tekući dušik
- Škare, Knipex ili druga naprava za rezanje žice
- Kultivacijski medij s proteinom, prethodno ekvilibriran na 37 °C u inkubatoru s CO₂ prije odmrzavanja.
- Inkubator od 37 °C bez CO₂ ili stolić za zagrijavanje

UPUTE ZA UPORABU

Komponente kompleta Vit Kit-Thaw (za svaku primjenu)

- 250 µl otopine za odmrzavanje Thawing Solution-TS
- 50 µl otopine za razrjeđivanje Dilution Solution-DS
- 100 µl otopine za ispiranje Washing Solution-WS

PROTOKOL ZAGRIJAVANJA

(ZA OOCITE I EMBRIJE):

NAPOMENA: Koraci zagrijavanja uključuju uranjanje uređaja u otopinu TS pri 37 °C te razrjeđivanje i ispiranje u otopinama DS i WS na sobnoj temperaturi.

1. Pripremite zdjelicu za zagrijavanje (kako je prikazano na prikazu uređaja HSV):
 - Pri 37 °C: Aseptički dodajte 250 µl otopine TS u sterilnu zdjelicu s 4 jažice ili zdjelicu za kultivaciju organa i stavite zdjelicu u inkubator od 37 °C bez CO₂ ili na stolić za zagrijavanje barem 30 minuta prije zagrijavanja.
- NAPOMENA: Oocitima dodajte najmanje 1 ml otopine TS.
2. Utvrdite koje slamke HSV Straw treba zagrijati iz pohrane s LN₂ i brzo ih prenesite u spremnik napunjen tekućim dušikom (LN₂) da biste ih pripremili za odmrzavanje.
3. Stavite spremnik napunjen tekućim dušikom (LN₂) blizu mikroskopa da bi kasnije bila moguća brza manipulacija.
4. Uklonite zdjelicu s otopinom DS iz inkubatora od 37 °C ili sa stolića za zagrijavanje i stavite je pod objektiv na vrh mikroskopskog stolića.
5. Podignite slamku toliko da otkrijete obojeni štapić za rukovanje. Kraj s uzorkom (uzorcima) mora ostati uronjen u LN₂.
6. Napravom Knipex (ili drugom napravom za rezanje žice) prerežite slamku na visini obojenog štapića za rukovanje. Crvena vodilica za duljinu rezanja na napravi Knipex treba biti namještena u položaj maksimalne duljine ili uklonjena.
 - Druga je mogućnost da palcem i ostalim prstima okrećete slamku dok režete škarama 10 mm ispod vrha obojenog štapića za rukovanje.
7. Jednim brzim ili kontroliranim pokretom prihvatite štapić za rukovanje i izvucite ga iz slamke.
8. Odmah uronite žlijeb u otopinu TS pri 37 °C TS, nježno miješajte da biste odvojili uzorak od uređaja i ostavite ga 1 minutu.

Korake 9. – 12. morate izvršiti na sobnoj temperaturi (22 – 27 °C).

- Pri sobnoj temperaturi: Aseptički dodajte jednu (1) kap otopine DS od 50 µl na sterilnu Petrijevu zdjelicu.
9. Usišite male otopine DS u prijenosnu pipetu i prenesite uzorak (uzorke) iz kapi otopine TS s minimalnim volumenom u kap otopine DS na 4 minute.

NAPOMENA: Uzorak će ostati smanjen dok je izložen otopini DS.

TIJEKOM TOGA RAZDOBLJA PRIPREMITI DVIJE KAPI OTOPINE WS OD 50 µl (WS1, WS2) KAKO JE PRIKAZANO NA PRIKAZU UREĐAJA HSV.

10. Prenesite uzorak (uzorke) u kap otopine WS (WS1) na 4 minute.

NAPOMENA: Uzorak (uzorci) bi se trebao vratiti u prvotnu veličinu unutar 2 – 3 minute stajanja u otopini WS.
11. Zatim prenesite uzorak (uzorke) u drugu kap otopine WS (WS2) na 4 minute.
12. Prije daljnjih manipulacija prenesite zagrijani OOCIT(E) u prethodno ekvilibrirani kultivacijski medij s 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml da bi se oporavio (2 – 3 sata kako bi bilo dovoljno vremena za ponovno oblikovanje diobenog vretena).

Postoje dvije mogućnosti za zagrijani EMBRIO (EMBRIJE):

- a) Ako se odmah prenosi u pacijenticu: prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u unaprijed ekvilibrirani medij za prijenos koji sadrži 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml.
- b) Ako se dalje kultivira: prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u unaprijed ekvilibrirani kultivacijski medij koji sadrži 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml na 4 sata kako bi se oporavio. Nakon razdoblja oporavka prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u kultivacijski medij s 10 % (v/v) proteina i inkubirajte na odgovarajući način dok embrio ne dostigne željeni stadij razvoja za prijenos u pacijenticu.

NAPOMENA: Oporavljeni oociti moraju se oploditi intracitoplazmatskom spermalnom injekcijom (ICSI) da bi se nakon vitifikacije postigla optimalna oplodnja.

ZA ZAGRIJAVANJE UREĐAJA CRYOLOCK™ KAO NOSITELJA:

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU UKLJUČENI U OPSEG ISPORUKE

- Sterilna zdjelica s 4 jažice ili male sterilne Petrijeve zdjelice (35 x 10 mm ili proizvod jednake kvalitete)
- Rukavice za jednokratnu uporabu
- Prijenosne pipete
- Štoperica ili brojač vremena
- Spremnik tekućeg dušika
- Tekući dušik
- Kultivacijski medij s proteinom, prethodno ekvilibriran na 37 °C u inkubatoru s CO₂ prije odmrzavanja
- Inkubator od 37 °C bez CO₂ ili stolić za zagrijavanje
- Kliješta

UPUTE ZA UPORABU

Komponente kompleta Vit Kit-Thaw (za svaku primjenu)

- 1 ml otopine za odmrzavanje Thawing Solution-TS
- 50 µl otopine za razrjeđivanje Dilution Solution-DS
- 100 µl otopine za ispiranje Washing Solution-WS

PROTOKOL ZAGRIJAVANJA

NAPOMENA: Koraci zagrijavanja uključuju uranjanje uređaja u otopinu TS pri 37 °C te razrjeđivanje i ispiranje u otopinama DS i WS na sobnoj temperaturi.

1. Pripremite zdjelicu za odmrzavanje (kao što je prikazano na prikazu uređaja Cryolock, slika 1.):
 - Pri 37 °C: Aseptički dodajte minimalni volumen od 1 ml otopine TS i grijte na 37 °C u inkubatoru bez CO₂ ili na stoliću za zagrijavanje najmanje 30 minuta prije nego što započnete zagrijavanje.
2. Utvrdite koje uzorke u uređaju Cryolock treba zagrijati i brzo ih prenesite iz pohrane s LN₂ u spremnik napunjen tekućim dušikom (LN₂) da biste ih pripremili za zagrijavanje.
3. Položite spremnik napunjen tekućim dušikom (LN₂) blizu radnog područja i mikroskopskog stolića da bi kasnije bila moguća brza manipulacija iz spremnika u otopinu TS.

4. Uklonite zdjelicu s otopinom TS iz inkubatora od 37 °C ili sa stolića za zagrijavanje i stavite je pod objektiv na vrh mikroskopskog stolića.
5. Klijestima držite gornji kraj tijela uređaja Cryolock tako da je identifikacijska naljepnica okrenuta prema gore.
 Opcija A: Brzo ali nježno skinite čep pod tekućim dušikom (LN₂) tako da zakrećete dijelove dok se ne odvoje.
 Opcija B: Brzo izvadite Cryolock iz tekućeg dušika (LN₂) i blagim zakretanjem brzo skinite čep.
- NAPOMENA: Laboratorij treba pratiti vlastite postupke i protokole. Opcija A nije odobrena u SAD-u.
6. Odmah uronite udubljeni vrh uređaja Cryolock u otopinu TS pri 37 °C tako da je uzorak (uzorci) okrenut prema gore. Pod mikroskopom nježno pomičite Cryolock dok se uzorak (uzorci) ne odvoji od vrha.
7. Ostavite uzorak (uzorke) 1 minutu u otopini TS.
8. Trideset (30) sekundi nakon prvotnog uranjanja nježno pipetirajte uzorak (uzorke) koji plutaju i stavite ih na dno otopine TS.

Korake 9. – 12. morate izvršiti na sobnoj temperaturi (22 – 27 °C).

- Pri sobnoj temperaturi: Aseptički dodajte jednu (1) kap otopine DS od 50 µl na sterilnu Petrijevju zdjelicu (pogledajte prikaz uređaja Cryolock, sliku 2.).

9. Prenesite uzorak (uzorke) u otopinu DS na 4 minute. Jedanput nježno pipetirajte uzorke da biste osigurali da se potpuno isperu u otopini DS.

NAPOMENA: Uzorak će ostati smanjen dok je izložen otopini DS.

10. Tijekom 4 minute izlaganja u otopini DS aseptički dodajte dvije (2) kapi od 50 µl otopine WS (WS1, WS2) kako je prikazano na slici.
11. Prenesite uzorak (uzorke) u WS1 i potom u WS2 te ga ostavite po 4 minute bez intervencija.

NAPOMENA: Uzorak (uzorci) bi se trebao vratiti u prvotnu veličinu unutar 2 – 3 minute stajanja u otopini WS.

12. Prije daljnjih manipulacija prenesite zagrijani OOCITE u prethodno ekvilibrirani kultivacijski medij s 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml da bi se oporavio (2 – 3 sata kako bi bilo dovoljno vremena za ponovno oblikovanje diobenog vretena).

Postoje dvije mogućnosti za zagrijani EMBRIO (EMBRIJE):

- a) Ako se odmah prenosi u pacijenticu: prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u unaprijed ekvilibrirani medij za prijenos koji sadrži 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml.
- b) Ako se dalje kultivira: prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u unaprijed ekvilibrirani kultivacijski medij koji sadrži 20 % (v/v) proteinskog dodatka ili 12 mg/ml na 4 sata kako bi se oporavio. Nakon razdoblja oporavka prenesite EMBRIO (EMBRIJE) u kultivacijski medij s 10 % (v/v) proteina i inkubirajte na odgovarajući način dok embrio ne dostigne željeni stadij razvoja za prijenos u pacijenticu.

Za dodatne pojedinosti o primjeni ovih proizvoda svaki laboratorij treba proučiti vlastite laboratorijske postupke i protokole koji su posebno razvijeni i optimirani za njihov individualni medicinski program.

UPUTE O SKLADIŠTENJU I STABILNOST

Neotvorene ampule skladištite u hladnjaku na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Kada se otopine iz kompleta Vitricification Thaw Kit skladište prema uputama, stabilne su do roka valjanosti navedenog na naljepnicama ampula.

Ne upotrebljavajte medije dulje od osam (8) tjedana nakon otvaranja spremnika.

Budući da proizvod sadrži materijal ljudskog podrijetla, u njemu mogu nastati čestice tijekom skladištenja. Nije poznato da ta vrsta čestica ikako utječe na funkciju proizvoda.

MJERE OPREZA I UPOZORENJA

Ovaj je proizvod namijenjen samo osoblju koje je obučeno za postupke potpomognute oplodnje. Ti postupci uključuju predviđenu primjenu za koju je proizvod namijenjen.

Ustanova u kojoj se upotrebljava ovaj proizvod odgovorna je za osiguravanje sljedivosti proizvoda i mora postupati u skladu s nacionalnim propisima o sljedivosti, kada je to primjenjivo.

Ne upotrebljavajte nijednu ampulu s otopinom koja pokazuje znakove štete, curenja, čestica, zamagljenja ili promjene boje. Odložite proizvod u otpad prema mjerodavnim propisima.

Da biste izbjegli probleme s kontaminacijom, rukujte s pomoću aseptičkih tehnika.

U najnovijoj istraživačkoj literaturi navedeno je da su i dalje nepoznati dugoročni učinci vitifikacije na oocyte i embrije.

Ne upotrebljavajte nijednu bočicu čijem je pakiranju narušena sterilnost.

EU: Standardne mjere za sprečavanje infekcija koje su uzrokovane upotrebom medicinskih proizvoda pripremljenih od ljudske krvi ili plazme uključujući odabir davatelja, probir pojedinih davanja i sjedinjenja plazme za specifične markere infekcije te primjenu učinkovitih proizvodnih koraka za inaktivaciju/uklanjanje virusa. Unatoč tome nije moguće potpuno isključiti mogućnost prijenosa zaraznih agensa kada se daju proizvodi od ljudske krvi ili plazme. To također vrijedi za nepoznate ili novonastale viruse ili druge patogene. Nisu prijavljeni dokazani prijenosi virusa albuminom koji je proizveden utvrđenim postupcima prema specifikacijama Europske farmakopeje. Preporučujemo da pri svakom davanju reproduktivnih kultivacijskih medija društva Irvine Scientific, LLC pacijentima zabilježite naziv i serijski broj proizvoda da biste održali vezu između pacijenta i serije proizvoda.

SAD: Ovaj proizvod sadrži Human Serum Albumin (HSA). Materijal humanog podrijetla korišten u proizvodnji ovoga proizvoda ispitivan je s pomoću kompleta koje je odobrila američka Agencija za hranu i lijekove te je utvrđeno da ne reagira na protutijela na hepatitis C (HCV) ni na protutijela na virus humane imunodeficiencije (HIV). Međutim, nijednom ispitnom metodom nije moguće potpuno potvrditi da proizvodi ljudskog podrijetla nisu zarazni. Rukujte svim materijalima ljudskog podrijetla kao da su u stanju prenijeti infekciju i primijenite univerzalne mjere opreza. Davatelji materijala za proizvode ljudskog podrijetla također su pregledani u odnosu na Creutzfeld-Jakobovu bolest (CJD).

KONTRAINDIKACIJA

Proizvod sadrži gentamicin sulfat. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza da biste osigurali da pacijent nije osjetljiv na ovaj antibiotik.

MALTI

TIWISSIJA GHALL-UE: Ghall-Użu Professionali Biss.

INDIKAZZJONI GHALL-UŻU

Vit Kit-Thaw (Vitrification Thaw Kit) huwa mahsub għall-użu biex iħoll oċiti vvitrifikati (MI), zygotes pronukleari (PN) permezz ta' embrijuni tal-istadju tal-qsim tat-3 jum u embrijuni tal-istadju tal-blastocist li ġew ivvitrifikati bl-użu tal-Vitrification Freeze Kit (Katalgu # 90133-SO).

DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

Thawing Solution-TS hija soluzzjoni ta' Medium-199 ibbaferjata b'HEPES li fiha Gentamicin Sulfate, 1.0 M sucrose u 20% (v/v) ta' Dextran Serum Supplement (DSS).

Dilution Solution-DS hija soluzzjoni ta' Medium-199 ibbaferjata b'HEPES li fiha Gentamicin Sulfate, 0.5M sucrose u 20% (v/v) ta' DSS.

Washing Solution-WS hija soluzzjoni ta' Medium-199 ibbaferjata b'HEPES li fiha Gentamicin Sulfate u 20% (v/v) ta' DSS.

DSS huwa supplement tal-proteini li jikkonsisti f'50 mg/mL ta' Albumina ta' Serum Uman (HSA) ta' grad terapewtiku u 20 mg/mL Dextran. DSS jintuża f'koncentrazzjoni ta' 20% (v/v) f'Vit Kit-Thaw għal koncentrazzjoni finali ta' 10 mg/mL HSA u 4 mg/mL Dextran.

Dawn it-tliet soluzzjonijiet għandhom jintużaw f'sekwenza skont il-protokoll tat-tishin gradwali tal-microdrop.

GHAMLA

<u>Mluha u Joni</u>	Nicotinic Acid Amide	<u>Sors tal-Proteini</u>	Lysine	Hydroxyproline
Sodium Chloride	Pantothenic Acid	Human Serum Albumin	Proline	Cystine
Sodium Phosphate	Riboflavin	<u>Buffers</u>	Tyrosine	<u>Qhrajn</u>
Potassium Chloride	Pyridoxine	Sodium Bicarbonate	Alanine	Guanine
Magnesium Sulfate	Thiamine	HEPES	Aspartic Acid	Hypoxanthine
Sodium Acetate	Biotin	<u>Indikatur tal-pH</u>	Glutamic Acid	Thymine
Calcium Chloride	Alpha-Tocopherol	Phenol Red	Isoleucine	Uracil
Ferric Nitrate	Sodium Bisulfite	<u>Makromolekoli</u>	Leucine	Xanthine
Choline Chloride	<u>Antiossidant</u>	Sucrose	Methionine	Adenosine
<u>Vitami u Minerali</u>	Glutathione	Dextran	Phenylalanine	Adenine Sulfate
Ascorbic Acid	<u>Antibijotiku</u>	<u>Aċidi Amminiċi</u>	Serine	Deoxyribose
Aminobenzoic Acid	Gentamicin Sulfate	Arginine	Threonine	Ribose
Calciferol	<u>Substrati tal-Energija</u>	Glycine	Tryptophan	<u>Ilma</u>
Folic Acid	Glucose	Histidine	Valine	Kwalità tal-WFI
Nicotinic Acid	Inositol		Cysteine	

ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

Is-soluzzjonijiet ta' Vit Kit-Thaw huma ffiltrati minn membrana u pproċessati b'mod asettiku skont proċeduri tal-manifattura li ġew invalidati.

Kull lott ta' Vit Kit-Thaw jirċievi t-testijiet li ġejjin:

Soluzzjonijiet:

Endotossina bil-metodoloġija Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (≤ 0.6 EU/mL)

Mouse Embryo Assay (b'ċellola wahda) ($\geq 80\%$ tal-Blastocist estżi)

Sterilità permezz ta' Test ta' Sterilità attwali tal-USP <71> (Riżultat Pożittiv)

Ir-riżultati kollha huma rrapportati fuq Ċertifikat ta' Analizi speċifiku għal-lott li huwa disponibbli meta mitlub.

BIEX TISSAĦĦAN IL-CRYOTIP BĦALA TAGHMIR TAT-TRASPORT:

MATERJALI MEHTIEĠA IŻDA MHUX INKLUŻI

- Konnettur (Katalgu #40736) jew adattur
- Dixxijiet petri sterili (50 X 9 mm, Falcon 351006 jew ekwivalenti)
- Inġwanti li jintremew wara l-użu
- Siringa Hamilton GASTIGHT® (50 µl) katalgu #80901
- Pipetti għat-trasferiment (pipetti tal-ħġieġ imġebbed jew ponot tal-mikropipetti b'dijametru intern tal-ponta ta' ~200 µm)
- Pinzetta
- Kronometru jew taghmir li jzomm il-hin
- Kontenitur għan-nitroġenu likwidu (kontenitur dewar jew tal-istyrafoam bl-ghatu, volum ta' 1-2 L)
- Nitroġenu likwidu (volum biżżejjed biex jiġihaq fond ta' 4 pulzieri (10 cm) fil-kontenitur)
- Imqass jaqta' (sterili)
- Banju ilma b'temperatura ta' 37°C
- Midjum għall-kultura bil-proteini, ekwibrat minn qabel għal temperatura ta' 37°C f'inkubatur tas-CO₂ qabel il-proċedura biex tholl.
- Inkubatur b'temperatura ta' 37°C mingħajr CO₂, jew bażi tat-tishin.

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Komponenti tal-Vit Kit-Thaw (għal kull applikazzjoni):

- 50 µl ta' Thawing Solution-TS
- 50 µl ta' Dilution Solution-DS
- 100 µl ta' Washing Solution-WS
- 1 Konnettur

PROTOKOLL TAT-TISHIN

(GHAL OOĊITI U EMBRIJUNI):

- NOTA: Il-proċeduri għandhom isiru f'temperatura ambjentali (20-27°C). TUŻAX pjattaforma tal-mikroskopju msahħna għall-proċeduri li ġejjin.
- ATTENZJONI: Imminimizza l-espożizzjoni tal-kampjun għad-dawl waqt il-manipulazzjonijiet permezz tas-soluzzjonijiet biex iħollu.
- Gib il-kwantità ta' TS, DS u WS li għandha tintuża għal temperatura ambjentali (20-27°C) qabel issaħħan il-kampjuni vvitifikati.
NOTA: Evita li ġgib il-kunnettji kollha ta' TS, DS u WS għal temperatura ambjentali ripetutament meta kull darba tkun meħtieġa kwantità żgħira tas-soluzzjoni. Ikun aħjar li tagħmel il-kwantità li għandha tintuża f'alikwoti u tirritorna l-kunnettji għal temperatura ta' 2-8°C minnufih wara jsiru l-alikwoti.
 - Imla l-kontenitur tan-nitroġenu likwidu bin-nitroġenu likwidu (mimli ~80 %) u poġġih viċin tal-frīża bil-LN₂ li fiha l-kampjuni li għandhom jinħallu.
 - Nehhi l-qasab bil-goblets li fihom il-CryoTips bil-kampjuni vvitifikati mill-ħażna tan-nitroġenu likwidu u ttrasferihom fil-kontenitur mimli bin-nitroġenu likwidu.
ATTENZJONI: Kun żgur li l-CryoTips jibqgħu mgħaddsin fil-LN₂ (fil-goblet) matul it-trasferiment mill-ħażna għall-kontenitur tal-LN₂ biex tevita li l-kampjuni jinħallu b'mod mhux ikkontrollat.
Poġġi l-kontenitur viċin il-mikroskopju għal manipulazzjoni mgħaġġla.
Wahhal tikketta bl-informazzjoni meħtieġa mad-dixx ta' Petri (jew għatu) sterili.
 - Bil-mod aqleb kull kunnett ta' TS, DS u WS rasu 'l isfel darbejn biex thawwad il-kontenut qabel l-użu.
 - Ipprepara d-dixx bil-qtar tas-soluzzjonijiet għall-proċeduri tat-tishin li ġejj: idistribwixxi b'teknika aseptika sekwenza ta' 2 microdrops fuq għatu bil-maqleb ta' dixx Petri sterili kif muri fil-Figura 1, u poġġi d-dixx fuq il-baži tal-mikroskopju:
 - qatra waħda ta' 50 µl ta' TS
 - qatra waħda ta' 50 µl ta' DS
 - (Zewġ qatriet ta' WS se jiġu ppreparati aktar tard fil-fażi numru 11)
 - Poġġi l-banju bl-ilma b'temperatura ta' 37°C viċin il-mikroskopju. Żomm dawn li ġejjin viċin tiegħek: pipetta tat-trasferiment u puntali, imqass jaqta' sterili, siringa Hamilton u karti assorbenti sterili.
 - Bl-użu ta' pinzetta (jew tnaljetti), irkupra l-CryoTip speċifika mill-lastha fin-nitroġenu likwidu, malajr għaddas il-CryoTip fil-banju tal-ilma b'temperatura ta' 37°C (≥ 500 mL) u dawwar bil-mod għal 3 sekondi biex issaħħan (ara l-Figura 2) għal + 24,000°C/min.
 - Malajr idistribwixxi l-kontenut ta' CryoTip kif ġej (ara l-Figura 3):
 - Imsaħ il-CryoTip malajr b'karta assorbenti sterili
 - Nehhi s-sleeve li tghatti l-metal
 - Aqta' s-sigill fuq it-tarf il-wiesja' tal-CryoTip fil-Marka #4
 - Wahhal it-tarf il-wiesja' tal-CryoTip b'mod sigur ma' siringa Hamilton jew ma' għodda tal-aspirazzjoni xierqa bl-użu ta' konnettur jew adattur.
NOTA: Iġbed il-plunger tas-siringa madwar 0.5 pulzier (1.3 cm) qabel twaħħal is-siringa mal-Konnettur u l-CryoTip.
 - Bil-mod imsaħ u xxotta l-ponta fina b'karta assorbenti sterili.
 - Waqt li żżomm il-CryoTip fuq id-dixx ippreparat biex iħoll, aqta' malajr is-sigill fuq il-Marka #2 tat-tarf tal-ponta fina u ddistribwixxi l-kontenut tal-CryoTip f'forma ta' qatra żgħira (~ 1 µl) fuq parti niexfa tad-dixx fuq il-qatra ta' TS (ara l-Figura 4).
NOTA: EVITA LI JIFFORMAW IL-BZIEŻAQ META TIDDI DISTRIBWIXXI IL-KONTENUT.
 - Għaqqad il-qatra ta' TS mal-kontenut tal-CryoTip u stenna t-tahlit gradwali għal minuta (ara l-Figura 4).
Nota: Il-kampjuni jinxtorbu u jitlejgħu fil-wieċ tal-qatra.
NOTA: Wara kull trasferiment tal-kampjuni, onfoħ il-fluwidu li jibqa' 'l barra mill-pipetta tat-trasferiment u iġbed f'tit mis-soluzzjoni mill-qatra li jmiss qabel il-manipulazzjoni li jmiss. Evita li jifformaw il-bzieżaq matul it-trasferimenti.
 - Iġbed f'tit DS fil-pipetta tat-trasferiment u ttrasferixxi l-kampjun(i) mill-qatra ta' TS b'volum minimu tal-qatra ta' DS għal 4 minuti.
NOTA: Il-kampjun jibqa' mixrub matul l-espożizzjoni għal DS.
MATUL L-ISTENNIIJA PPREPARA Ż-ZEWĠ QATRIET TA' 50 µl TA' WS (WS1, WS2), KIF MURI FIL-FIGURA 4.
 - Ittrasferixxi l-kampjun(i) fil-qatra ta' WS (WS1) għal 4 minuti.
NOTA: Il-kampjuni għandhom jergħu jespandu għall-qies originali fi żmien 2-3 minuti fil-WS.
 - Imbagħad ittrasferixxi l-kampjun(i) fit-tieni qatra ta' WS (WS2) għal 4 minuti.
 - Ittrasferixxi l-OOĊITI msahħna fil-midjum għall-kultura ekwilibrat minn qabel b'20% (v/v) ta' supplement tal-proteini jew 12 mg/mL għall-irkupru (2-3 sigħat biex tippermetti l-formazzjoni mill-ġdid tal-ispinde) qabel manipulazzjonijiet sussegwenti.
Jezistu zewġ għażijiet għal EMBRIJUN(I) msahħna:
 - Għat-trasferiment immedjat lill-pazjent: ittrasferixxi l-EMBRIJUN(I) għall-midjum 'tat-trasferiment' ekwilibrat minn qabel li fih 20% (v/v) supplement tal-proteini jew 12 mg/mL.
 - Għat aktar kultura: ittrasferixxi l-EMBRIJUN(I) għall-midjum għall-kultura ekwilibrat minn qabel li fih 20% (v/v) supplement tal-proteini jew 12 mg/mL għal perjodu ta' rkupru ta' 4 sigħat. Wara l-perjodu ta' rkupru, ittrasferixxi l-EMBRIJUNI għal midjum għall-kultura b'10% (v/v) proteini u inkubahom skont il-każ sakemm jintlaħaq l-istadju tal-iżvilupp mixtieġ għat-trasferiment lill-pazjent.

BIEX ISSAĤĤAN IT-TAGHMIR TA' HSV BĤALA TAGHMIR TAT-TRASPORT:

MATERJALI MEĤTIEĠA IŻDA MHUX INKLUŻI

- Dixx b'4 hofor sterili (Nunc 179830, 144444 jew ekwivalenti), jew dixx għall-kultura tal-organi (BD Falcon 353037)
- Ingwanti li jintremew wara l-użu
- Pipetti tat-trasferiment
- Pinzetta
- Kronometru jew tagħmir li jżomm il-hin
- Kontenitur għan-nitroġenu likwidu
- Nitroġenu likwidu
- Imqass, Knipex jew tagħmir ieħor għall-qtuġħ tal-wajer
- Midjum għall-kultura bil-proteini, ekwilibrat minn qabel għal temperatura ta' 37°C f'inkubatur tas-CO₂ qabel il-proċedura biex tħoll.
- Inkubatur b'temperatura ta' 37°C mingħajr CO₂, jew baži tat-tishin

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Komponenti tal-Vit Kit-Thaw (ghal kull applikazzjoni)

- 250 µl ta' Thawing Solution-TS
- 50 µl ta' Dilution Solution-DS
- 100 µl ta' Washing Solution-WS

PROTOKOLL TAT-TISHIN

(GHAL OOĊITI U EMBRIJUNI):

NOTA: Il-fażijiet tat-tishin jinkludu l-immersjoni tat-taghmir fit-TS b'temperatura ta' 37°C u l-dilwizzjoni u l-hasil sussegwenti fid-DS u l-WS b'temperatura ambjentali

1. Ipprepara d-dixxijiet tat-tishin (kif muri fid-dijagramma tat-taghmir HSV):
 - B'temperatura ta' 37°C: Iddistribwixxi b'teknika asettika 250 µl ta' TS f'dixx b'4 hofor sterili jew dixx għall-kultura tal-organi u qiegħed f'inkubatur b'temperatura ta' 37°C minghajr CO₂ jew fuq bażi tat-tishin għal mill-anqas 30 minuta qabel il-proċedura tat-tishin
- NOTA: Għall-ooċiti, iddistribwixxi mill-anqas 1 mL ta' TS
2. Identifika l-HSV Straw(s) li għandhom jissahhnu mill-hażna ta' LN₂ u ttrasferihom malajr fil-kontenitur mimli bil-LN₂ għall-preparazzjoni tal-proċedura biex tholl.
3. Poġġi l-kontenitur tal-LN₂ viċin il-mikroskopju għall-manipulazzjoni rapida sussegwenti.
4. Nehhi d-dixx tat-TS mill-inkubatur b'temperatura ta' 37°C jew bażi tat-tishin u poġġi fuq il-pjattaforma tal-mikroskopju taht il-lenti għall-iffokar.
5. Għolli l-istraw 'l fuq biżżejjed biex tesponi l-virga tal-manipulazzjoni kkulurita. Kun ċert li t-tarf tal-kampjun(i) jibqa' mgħaddas fil-LN₂.
6. Uża KnipeX (jew taghmir ieħor tal-qtuġ tal-wajer) biex taqta' l-istraw fl-gholli tal-virga tal-manipulazzjoni kkulurita. Il-gwida tat-tul tal-qatgħa hamra fuq il-KnipeX għandha tkun ippożizzjonata fil-pożizzjoni tal-ogħla tul jew imnehhija.
 - Inkella, uża s-s-waba' u s-saba' l-kbir biex iddawwar l-istraw filwaqt li tagħmel movimenti tal-qtuġ bl-imqass, 10 mm 'l isfel mit-tarf tal-virga tal-manipulazzjoni kkulurita.
7. B'moviment rapidu u kkontrollat, aqbad malajr il-virga tal-manipulazzjoni u iġbidha 'l barra mill-istraw.
8. Immedjatament għaddas il-kanal fit-TS b'temperatura ta' 37°C u dawwar bil-mod biex jinqatgħu l-kampjuni mit-taghmir u stenna minuta (1).

Il-fażijiet 9-12 għandhom isiru b'temperatura ambjentali (22-27°C).

- B'temperatura ambjentali: Iddistribwixxi b'teknika asettika qatra waħda (1) ta' 50 µl ta' DS fuq dixx Petri sterili
9. Iqbed fit-TS fil-pipetta tat-trasferiment u ttrasferixxi l-kampjun(i) mill-qatra ta' TS bil-volum minimu tal-qatra ta' DS għal 4 minuti.
NOTA: Il-kampjun jibqa' mixrub matul l-espożizzjoni għal DS.
MATUL L-ISTENNIJA PPREPARA Ż-ŻEWĠ QATRIET TA' 50 µl TA' WS (WS1, WS2), KIF MURI FID-DIJAGRAMMA TAT-TAGHMIR HSV.
10. Ittrasferixxi l-kampjun(i) fil-qatra ta' WS (WS1) għal 4 minuti.
NOTA: Il-kampjun(i) għandhom jerġghu jespandu għall-qies oriġinali fi żmien 2-3 minuti fil-WS.
11. Imbagħad ittrasferixxi l-kampjun(i) fit-tieni qatra ta' WS (WS2) għal 4 minuti.
12. Ittrasferixxi l-OOĊITI msahhna fil-midjum għall-kultura ekwilibrat minn qabel b'20% (v/v) ta' supplement tal-proteini jew 12 mg/mL għall-irkupru (2-3 sigħat biex tippermetti l-formazzjoni mill-ġdid tal-ispidle) qabel manipulazzjonijiet sussegwenti.
Jeżistu żewġ għażijiet għal EMBRIJUN(I) msahhna:
 - a) Għat-trasferiment immedjat lill-pazjent: ittrasferixxi l-EMBRIJUN(I) għall-midjum "tat-trasferiment" ekwilibrat minn qabel li fi 20% (v/v) supplement tal-proteini jew 12 mg/mL.
 - b) Għal aktar kultura: ittrasferixxi l-EMBRIJUN(I) għall-midjum għall-kultura ekwilibrat minn qabel li fi 20% (v/v) supplement tal-proteini jew 12 mg/mL għal perjodu ta' rkupru ta' 4 sigħat. Wara l-perjodu ta' rkupru, ittrasferixxi l-EMBRIJUN għal midjum għall-kultura b'10% (v/v) proteini u inkubahom skont il-każ sakemm jintlaħaq l-istadju tal-iżvilupp mixtieq għat-trasferiment lill-pazjent.

NOTA: L-ooċiti rkuprati jridu jkunu ffertilizzati bil-użu ta' ICSI għall-aħjar fertilizzazzjoni wara l-vitrifikazzjoni.

BIEX ISSAHHAN CRYOLOCK™ BHALA TAGHMIR TAT-TRASPORT:

MATERJALI MEHTIEĠA IŻDA MHUX INKLUŻI

- Dixx b'4 hofor sterili jew dixxijiet ta' Petri żgħar sterili (35 X 10 mm jew ekwivalenti)
- Ingwanti li jintremew wara l-użu
- Pipetti tat-trasferiment
- Kronometru jew taghmir li jzomm il-hin
- Kontenitur għan-nitroġenu likwidu
- Nitroġenu likwidu
- Midjum għall-kultura bil-proteini, ekwilibrat minn qabel għal temperatura ta' 37°C f'inkubatur tas-CO₂ qabel il-proċedura biex tholl
- Inkubatur b'temperatura ta' 37°C minghajr CO₂ jew bażi tat-tishin.
- Forċipi

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Komponenti tal-Vit Kit-Thaw (ghal kull applikazzjoni)

- 1 mL ta' Thawing Solution-TS
- 50 µL ta' Dilution Solution-DS
- 100 µL ta' Washing Solution-WS

PROTOKOLL TAT-TISHIN

NOTA: Il-fażijiet tat-tishin jinkludu l-immersjoni tat-taghmir fit-TS b'temperatura ta' 37°C u l-dilwizzjoni u l-hasil sussegwenti fid-DS u l-WS b'temperatura ambjentali

1. Ipprepara d-dixxijiet li jhollu (kif muri fid-dijagramma tal-Cryolock, Figura 1):
 - B'temperatura ta' 37°C: Iddistribwixxi b'teknika asettika volum minimu ta' 1 mL ta' TS u saħhan għal temperatura ta' 37°C f'inkubatur minghajr CO₂ jew bażi tat-tishin għal mill-anqas 30 minuta qabel tibda l-proċedura ta' tishin.
2. Identifika l-kampjun(i) ta' Cryolock li għandhom jissahhnu u ttrasferihom malajr mill-hażna tal-LN₂ għal kontenitur ta' transitu mimli b'LN₂ għall-preparazzjoni tal-proċedura tat-tishin.
3. Poġġi l-kontenitur mimli bil-LN₂ viċin hafna għall-post tax-xogħol u l-baži tal-mikroskopju biex tippermetti l-manipulazzjoni rapida sussegwenti mill-kontenitur għat-TS.

4. Nehhi d-dixx tat-TS mill-inkubatur b'temperatura ta' 37°C jew bażi tat-tishin u poġġih fuq il-pjattaforma tal-mikroskopju taht il-lenti għall-iffokar.
5. Bil-pinzetta, zomm il-parti ta' fuq tal-Cryolock bit-tikketta tal-identifikazzjoni thares 'il fuq.
Opzjoni A: Malajr iżda b'mod delikat nehhi t-tapp taht l-LN₂, waqt li ddawwar il-partijiet sakemm jinqatghu.
Opzjoni B: Malajr ohrog il-Cryolock mil-LN₂, imbagħad nehhi t-tapp malajr b'tidwira delikata.

NOTA: Il-laboratorju għandu jikkonsulta l-proċeduri u l-protokollu tiegħu. Opzjoni A mhijiex awtorizzata għall-użu fl-Istati Uniti.

6. Għaddas mill-ewwel il-ponta konkava tal-Cryolock, bil-kampjuni jħarsu 'l fuq, fit-TS b'temperatura ta' 37°C. Taht l-osservazzjoni bil-mikroskopju, ċaqlaq il-Cryolock bil-mod sakemm il-kampjuni jinqatghu mill-ponta.
7. Halli l-kampjuni fit-TS għal minuta (1).
8. Wara tletin (30) sekonda mill-ewwel immersjoni, bil-mod iġbor il-kampjuni bil-pipetta, jekk ikunu fil-wiċċ, u poġġihom fil-qiegħ tat-TS.

Il-fażijiet 9-12 għandhom isiru b'temperatura ambjentali (22-27°C).

- B'temperatura ambjentali: Iddistribwixxi b'teknika asettika qatra wahda (1) ta' 50 µL tad-DS fuq dixx Petri sterili (ara d-dijagramma tal-Cryolock, Figura 2)

9. Ittrasferixxi l-kampjuni għad-DS għal 4 minuti. Għor il-kampjuni bil-pipetta bil-mod biex tkun żgur li xxarrbu kompletament fid-DS.

NOTA: Il-kampjuni jibqas' mixrubb matul l-espożizzjoni għal DS.

10. Matul l-espożizzjoni għal 4 minuti fid-DS, iddistribwixxi b'teknika asettika żewġ (2) qatriet ta' 50 µL tal-WS (WS1, WS2) kif muri fid-dijagramma.

11. Ittrasferixxi l-kampjuni għal WS1 imbagħad għal WS2 għal 4 minuti kull wiehied, u hallihome mhux disturbati.

NOTA: Il-kampjuni għandhom jerġgħu jespandu għall-qies oriġinali fi żmien 2-3 minuti fil-WS.

12. Ittrasferixxi l-OOCIT1 msahhna fil-midjum għall-kultura ekwilibrat minn qabel b'20% (v/v) ta' supplement tal-proteini jew 12 mg/mL għall-irkupru (2-3 sigħat biex tippermetti l-formazzjoni mill-ġdid tal-ispidle) qabel manipolazzjonijiet sussegwenti.

Jeżistix żewġ għażliet għal EMBRIJUN(I) msahhna:

- a) Għal-trasferiment immedjat lill-pazjent: ittrasferixxi l-EMBRIJUNI għall-mezz 'tat-trasferiment' ekwilibrat minn qabel li fih 20% (v/v) supplement tal-proteini jew 12 mg/mL.
- b) Għal aktar kultura: ittrasferixxi l-EMBRIJUN(I) għall-midjum għall-kultura ekwilibrat minn qabel li fih 20% (v/v) supplement tal-proteini jew 12 mg/mL għal perjodu ta' rkupru ta' 4 sigħat. Wara l-perjodu ta' rkupru, ittrasferixxi l-EMBRIJUNI għal midjum għall-kultura b'10% (v/v) proteini u inkubahom skont il-każ sakemm jintlaħaq l-istadju tal-iżvilupp mixtieg għat-trasferiment lill-pazjent.

Għal aktar dettalji dwar l-użu ta' dawn il-prodotti, kull laboratorju għandu jikkonsulta l-proċeduri u l-protokollu tal-laboratorju tiegħu li jgħew iżviluppi u ottimizzazzjoni speċifikament għall-programm mediku individwali tiegħek.

ISTRUZZJONJIEŻ GĦALL-ĦAŻNA U L-ISTABBILITÀ

Ahzen il-kunjetti li għadhom mhux miftuħa fil-frigġ f'temperatura ta' 2°C sa 8°C. Meta jinħażnu skont l-istruzzjonijiet, il-vitrifikazzjoni Thaw Kit Solutions jibqgħu stabbli sad-data tal-iskadenza murija fuq it-tikketti tal-kunjetti.

Tużax il-midja għal aktar minn tmien (8) ġimgħat minn meta jinfethu l-kontenituri.

Peress li l-prodott fih materjal minn sors uman jista' jiżviluppa xi materja partikolata matul il-ħażna. Dan it-tip ta' materja partikolata mhux magħruf li għandu effett fuq il-prestazzjoni tal-prodott.

PREKAWZJONJIEŻ U TWISSIJET

Dan it-tagħmir huwa maħsub biex jintuża minn persunal imħarreg fil-proċeduri ta' riproduzzjoni assistita. Dawn il-proċeduri jinkludu l-applikazzjoni maħsuba li għaliha huwa intenzjonat dan it-tagħmir.

Il-faċilità tal-utent ta' dan it-tagħmir hija responsabbli biex iżżomm il-traċċabilità tal-prodott u trid tkun konformi mar-regolamenti nazzjonali dwar it-traċċabilità, fejn applikabbli.

Tużax xi kunjett tas-soluzzjoni li juri evidenza ta' ħsara, tnixxija, partikelli, soluzzjoni mdardra jew varjazzjonijiet fil-kulur. Armi l-prodott skont ir-regolamenti applikabbli.

Biex tevita problemi ta' kontaminazzjoni, immanipula bl-użu ta' teknika asettika.

Bħalissa, il-letteratura tar-riċerka tindika li l-effetti fit-tul tal-vitrifikazzjoni fuq l-oociti u l-embrijuni għadhom mhux magħrufa.

Tużax flixkun jekk l-ippakkjar sterili tiegħu jkollu l-ħsara.

UE: Mizuri standard biex jiġu evitati infezzjonijiet li jirriżultaw mill-użu ta' prodotti mediċinali ppreparati minn demm jew plazma umana jinkludu l-għażla tad-donaturi, skrinjng ta' donazzjonijiet individwali u ta' lotts ta' plazma għal markaturi speċifiċi ta' infezzjoni, u l-inkluzjoni ta' mizuri effettivi fil-proċess tal-manifattura għall-inattivazzjoni/tneħħija ta' viruses. Minkejja dan, meta jingħataw prodotti mediċinali ppreparati minn demm jew plazma umana, il-possibbiltà li organiżmi infettivi jiġu trażmessi ma tistax tiġi eskluża għal kollox. Dan japplika wkoll għal viruses u patoġeni oħrajn mhux magħrufa jew ġodda. M'hemm l-ebda rapporti evidenzjati ta' trażmissjonijiet virali bl-albumina li kienet immanifatturata skont speċifikazzjonijiet tal-Farmakopea Ewropea minn proċessi stabbli. Hu rakkomandat bil-qawwa li kull darba li l-midjum għall-kultura ta' Irvine Scientific, LLC Reproductive Media Products jingħata lill-pazjent, l-isem u n-numru tal-lott tal-prodott jiġu reġistrati sabiex tinzamm rabta bejn il-pazjent u l-lott tal-prodott.

L-Istati Uniti: Dan il-prodott fih Human Serum Albumin (HSA). Il-materjal ta' sors uman użat fil-manifattura ta' dan il-prodott ġie ttestjat minn kitti licenzjati mill-FDA u ntwerja li mhumiex reattivi għall-antikorpj tal-Epatite C (HCV), u għall-antikorpj tal-Virus tal-Immunodeficienza Umana (HIV). Madankollu, l-ebda metodu tal-ittestjar ma jista' joffri assigurazzjoni assoluta li l-prodotti ta' sors uman mhumiex infettużi. Ittratta kull materjal li ġej minn sors uman daqs li kieku jkun kapaċi jitrażmetti l-infezzjoni, billi tuża prekawzjonijiet universali. Donaturi tal-materjal tas-sors għew ittestjati wkoll għal CJD.

KONTRAINDIKAZZJONI

Il-prodott fih Gentamicin Sulfate. Għandhom jittieghu prekawzjonijiet adegwati biex ikun żgurat li l-pazjent mhux sensitizzat għal dan l-antibjotiku.

OPOZORILO ZA EU: Samo za profesionalno uporabo.

INDIKACIJE ZA UPORABO

Vit Kit-Thaw (komplet za odtajanje vitifikacije) je namenjen za uporabo v postopkih odtajanja vitificiranih oocitov (MII), pronuklearnih (PN) zigot prek zarodkov 3. dne cepitve in zarodkov v fazi blastociste, ki so bili vitificirani z uporabo kompleta Vitricification Freeze Kit (kataloška št. 90133-SO).

OPIS PRIPOMOČKA

Thawing Solution-TS je pufrana raztopina HEPES medija-199, ki vsebuje gentamicin sulfat, 1,0 M saharoze in 20 % (v/v) dopolnila seruma z dekstranom (DSS).

Dilution Solution-DS je pufrana raztopina HEPES medija-199, ki vsebuje gentamicin sulfat, 0,5 M saharoze in 20 % (v/v) DSS.

Washing Solution-WS je pufrana raztopina HEPES medija-199, ki vsebuje gentamicin sulfat in 20 % (v/v) DSS.

DSS je beljakovinski dodatek, ki je sestavljen iz 50 mg/ml humanega serumskega albumina (HSA) terapevtske kakovosti in 20 mg/ml dekstrana. DSS se uporablja pri koncentraciji 20 % (vol. %) v kompletu Vit Kit-Thaw za ustvarjanje končne koncentracije 10 mg/ml HSA in 4 mg/ml dekstrana.

Te tri raztopine se uporabljajo zaporedno skladno s protokolom postopnega segrevanja mikrokapljič.

SESTAVA

<u>Soli in ioni</u>	Amid nikotinske kisline	<u>Beljakovinski vir</u>	Lizin	Hidroksiprolin
Natrijev klorid	Pantotenska kislina	Humani serumski	Prolin	Cistin
Natrijev fosfat	Riboflavin	albumin	Tirozin	<u>Drugo</u>
Kalijev klorid	Pyridoksin	<u>Pufri</u>	Alanin	Gvanin
Magnezijev sulfat	Tiamin	Natrijev bikarbonat	Asparaginska kislina	Hipoksantin
Natrijev acetat	Biotin	HEPES	Glutaminska kislina	Timin
Kalcijev klorid	Alfa-tokoferol	<u>Indikator vrednosti pH</u>	Izolevcin	Uracil
Železov nitrat	Natrijev bisulfit	Fenol rdeče	Levcin	Ksantin
Holinklorid	<u>Antioksidant</u>	<u>Makromolekule</u>	Metionin	Adenozin
<u>Vitaminski in minerali</u>	Glutacion	Saharaza	Fenilalanin	Adenin sulfat
Askorbinska kislina	<u>Antibiotik</u>	Dekstran	Serin	Deoksiriboza
Aminobenzojska kislina	Gentamicin sulfat	<u>Aminokisline</u>	Treonin	Riboza
Kalciferol	<u>Energijski substrati</u>	Arginin	Triptofan	<u>Voda</u>
Folna kislina	Glukoza	Glicin	Valin	Kakovost, ki ustreza vodi
Nikotinska kislina	Inozitol	Histidin	Cistein	za injekcije

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

Raztopine v Vit Kit-Thaw so bile membransko filtrirane in aseptično obdelane skladno z validiranimi proizvodnimi postopki.

Pri vsaki seriji Vit Kit-Thaw so bili izvedeni naslednji preizkusi:

Raztopine:

- prisotnosti endotoksinov z reagentom LAL (Limulus Amebocyte Lysate) ($\leq 0,6$ EU/ml),
- preizkus z mišjimi embriji (ena celica) (≥ 80 % razširjena blastocista),
- sterilnosti s trenutnim testom USP za sterilnost <71> (opravljeno).

Vsi rezultati so navedeni na analiznem certifikatu za vsako serijo, ki je na voljo na zahtevo.

ZA SEGREVANJE KONICE CRYOTIP KOT NOSILCA:

POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILožENI

- Spojnik (kataloška št. 40736) ali adapter
- Sterilne petrijevke (50 X 9 mm, Falcon 351006 ali enakovredno)
- Rokavice za enkratno uporabo
- Brizga Hamilton GASTIGHT® (50 µl), kataloška št. 80901
- Prenosne pipete (pipete iz vlečenega stekla ali konice mikropipet z notranjim premerom konice ~200 µm)
- Pinceta
- Štoparica ali časovnik
- Rezervoar tekočega dušika (Dewarjeva posoda ali stiroporni vsebnik s pokrovom, prostornina 1–2 l)
- Tekoči dušik (zadostna prostornina za doseganje 4 palce (10 cm) globine v rezervoarju)
- Ostre škarje (sterilne)
- Vodna kopel 37 °C
- Gojišče za kulture z beljakovinami, predhodno ekvilibrirano na 37 °C v inkubatorju CO₂, pred postopkom odtajanja.
- 37 °C inkubator brez CO₂ ali grelna mizica.

NAVODILA ZA UPORABO

Komponente kompleta Vit Kit-Thaw (na uporabo):

- 50 µl raztopine Thawing Solution-TS
- 50 µl raztopine Dilution Solution-DS
- 100 µl raztopine Washing Solution-WS
- 1 spojnik

PROTOKOL SEGREVANJA

(ZA OOCITE IN EMBRIE):

- OPOMBA: Postopki se morajo opraviti pri sobni temperaturi (20–27 °C). Pri naslednjih postopkih NE uporabljajte ogrevane mizice mikroskopa.
- OPOZORILLO: Zmanjšajte izpostavljenost vzorca svetlobi zaradi manipulacije v talilnih raztopinah.
- Količina raztopin TS, DS in WS, ki bodo uporabljene, mora biti sobne temperature (20–27 °C) pred segrevanjem vitrificiranih vzorcev. OPOMBA: Izbogibajte se ponavljajočemu temperiranju celotnih vial z raztopinami TS, DS in WS na sobno temperaturo, če vsakič potrebujete le majhno količino raztopine. Bolje je razdeliti količino, ki bo uporabljena, in vrniti vialo na temperaturo 2–8 °C takoj po razdelitvi.
 - Napolnite rezervoar s tekočim dušikom (~ 80 % poln) in ga postavite v bližino zamrzovalnika LN₂, v katerem so vzorci, ki bodo odtajani.
 - Odstranite palčke s čašami, ki vsebujejo konice CryoTip z vitrificiranimi vzorci, iz vsebnika s tekočim dušikom ter jih prenesite v rezervoar, napolnjen s tekočim dušikom.
OPOZORILLO: Poskrbite, da bodo konice CryoTip ostale potopljene v LN₂ (v čaši) med prenosom iz vsebnika v rezervoar LN₂, da preprečite nenadzorovano odtajanje vzorcev.
Za hitro manipulacijo postavite rezervoar v bližino mikroskopa.
 - Z nalepkami s potrebnimi informacijami označite sterilno petrijevko (ali pokrovček).
 - Dvakrat nežno obrnite vsako vialo z raztopinami TS, DS in WS, da pred uporabo premešate vsebino.
 - Pripravite posodo s kapljicami raztopine za protokol segrevanja, kot sledi:
Zaporedno aseptično dodajte 2 mikrokapljici na obrnjen pokrov sterilne petrijeve, kot je prikazano na sliki 1, nato pa postavite posodo na mizico mikroskopa:
 - eno 50- μ l kapljico TS
 - eno 50- μ l kapljico DS
 - (dve kapljici WS boste pripravili pozneje pri 11. koraku)
 - Postavite vodno kopalnico 37 °C v bližino mikroskopa. V bližini imejte naslednje: prenosno pipeto in konice, sterilne ostre škarje, Hamiltonovo brizgo in sterilne robčke.
 - Z uporabo pincete (ali klešč) vzemite specifično konico CryoTip iz palčke v tekočem dušiku, hitro potopite konico CryoTip v 37 °C vodno kopalnico (≥ 500 ml) in nežno vrtinite 3 sekunde, da segrejete (glejte sliko 2) s hitrostjo +24.000 °C/min.
 - Hitro pripravite vsebino konice CryoTip na naslednji način (glejte sliko 3):
 - hitro obrišite konico CryoTip do suhega s sterilnim robčkom,
 - odstranite cevko kovinskega pokrova,
 - odrežite tesnilo na širokem koncu konice CryoTip pri oznaki št. 4,
 - trdno priključite široki konec konice CryoTip na Hamiltonovo brizgo ali ustrezno aspiracijsko orodje z uporabo spojnika ali adapterja,
 - OPOMBA: Dvignite bat brizge za približno 0,5 palca (1,3 cm), preden priključite brizgo na spojnik in konico CryoTip.
 - s sterilnim robčkom nežno obrišite fino konico do suhega,
 - s konico CryoTip nad pripravljeno talilno posodo hitro odrežite tesnilo pri oznaki št. 2 na koncu fine konice in razdelite vsebino konice CryoTip kot majhno količino (~ 1 μ l) na suhem območju posode nad kapljico TS (glejte sliko 4).OPOMBA: IZOGIBAJTE SE MEHURČKOM MED RAZDELJEVANJEM VSEBINE.
 - Združite kapljico TS z vsebino konice CryoTip in počakajte 1 minuto, da se postopno mešata (glejte sliko 4).
Opomba: Vzorci se bodo skrčili in splavali na vrh kapljice.
OPOMBA: Po vsakem prenosu vzorcev izpihajte preostalo tekočino v prenosni pipeti in pred naslednjo manipulacijo povlecite nekaj raztopine iz naslednje kapljice. Med prenosi preprečite nastanek mehurčkov.
 - Povlecite nekaj raztopine DS v prenosno pipeto in prenesite vzorec (vzorce) iz kapljice TS z minimalno količino v kapljico DS za 4 minute.
OPOMBA: Vzorec bo ostal med izpostavljanjem raztopini DS skrčen.
V TEM ČASU PRIPRAVITE DVE 50- μ l KAPLJICI RAZTOPINE WS (WS1, WS2), KOT JE PRIKAZANO NA SLIKI 4.
 - Prenesite vzorec (vzorce) v kapljico WS (WS1) za 4 minute.
OPOMBA: Vzorec (vzorci) bi se moral v raztopini WS znova razširiti na prvotno velikost v roku 2–3 minute.
 - Nato prenesite vzorec (vzorce) v drugo kapljico WS (WS2) za 4 minute.
 - Prenesite segrete OOCITE v predhodno ekvilibrirano gojišče za kulture z dodanimi 20 % (v/v) beljakovin ali 12 mg/ml za obnavljanje (2–3 ure, da omogočite ponovni nastanek vretena) pred nadaljnjimi manipulacijami.
Na voljo sta dve možnosti za segrete EMBRIE:
 - a) Za takojšnji prenos do bolnika: prenos EMBRIEV v predhodno ekvilibrirani »prenosni« medij, ki vsebuje 20 % (v/v) dodatka beljakovin ali 12 mg/ml.
 - b) Za nadaljnje kulture: prenos EMBRIEV v predhodno ekvilibrirano gojišče za kulture, ki vsebuje 20 % (v/v) dodatka beljakovin ali 12 mg/ml za 4-urno obdobje obnove. Po obdobju obnove prenesite EMBRIE v gojišče za kulture z 10 % (v/v) dodatka beljakovin in ustrezno inkubirajte, dokler ni dosežena zelena razvojna stopnja za prenos v bolnika.

ZA SEGREVANJE PRIPOMOČKA HSV KOT NOSILCA:

POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Sterilna 4-kanalna posoda (Nunc 179830, 144444 ali enakovredna) ali posoda za organske kulture (BD Falcon 353037)
- Rokavice za enkratno uporabo
- Prenosne pipete
- Pinceta
- Štoparica ali časovnik
- Rezervoar tekočega dušika
- Tekoči dušik
- Škarje, klešče ali drug pripomoček za rezanje žice
- Gojišče za kulture z beljakovinami, predhodno ekvilibrirano na 37 °C v inkubatorju CO₂ pred postopkom odtajanja.
- 37 °C inkubator brez CO₂ ali grelna mizica.

NAVODILA ZA UPORABO

Komponente kompleta Vit Kit-Thaw (na uporabo)

- 250 µl raztopine Thawing Solution-TS
- 50 µl raztopine Dilution Solution-DS
- 100 µl raztopine Washing Solution-WS

PROTOKOL SEGREVANJA

(ZA OOCITE IN EMBRIE):

OPOMBA: Koraki segrevanja vključujejo potapljanje pripomočka v 37 °C TS ter nato redčenje in splakovanje v DS oziroma WS pri sobni temperaturi

1. Pripravite posode za segrevanje (kot je prikazano na diagramu pripomočka HSV):
 - Pri 37 °C: Aseptično razdelite 250 µl raztopine TS v sterilno 4-kanalno posodo ali posodo za organske kulture in jo vstavite v 37 °C inkubator brez CO₂ ali na grelno mizico vsaj 30 minut pred postopkom segrevanja

OPOMBA: Za oocyte razdelite najmanj 1 ml raztopine TS

2. Vzemite slamico HSV, ki jo boste segrevali, iz vsebnika LN₂ in hitro prenesite v napolnjeni rezervoar LN₂, pripravljen za postopek odtajanja.
3. Za hitro manipulacijo postavite rezervoar LN₂ v bližino mikroskopa.
4. Odstranite posodo TS iz 37 °C inkubatorja ali z grelne mizice in jo namestite v fokus na vrh mizice mikroskopa.
5. Dvignite slamico toliko, da bo vidna obarvana upravljalna palčka. Poskrbite, da bo konec z vzorcem (vzorci) ostal potopljen v LN₂.
6. Uporabite klešče (ali drug pripomoček za rezanje žice), da odrežete slamico na višini obarvane upravljalne palčke. Rdeče rezalno vodilo na kleščah mora biti na najdaljši dolžini ali odstranjeno.
 - Alternativno lahko uporabite prste in palec, da zavrtite slamico med rezanjem s škarkari 10 mm pod vrhom obarvane upravljalne palčke.
7. S sunkovitim in nadzorovanim gibom hitro primite upravljalno palčko in jo izvlcite iz slamice.
8. Takoj potopite kanal v 37 °C raztopino TS in nežno sukajte, da ločite vzorce iz pripomočka, nato pa pustite tako 1 minuto.

Korake 9–12 je treba izvesti pri sobni temperaturi (22–27 °C).

- Pri sobni temperaturi: Aseptično razdelite eno (1) 50-µl kapljico raztopine DS na sterilno petrijevko

9. Povlecite nekaj raztopine DS v prenosno pipeto in prenesite vzorec (vzorci) iz kapljice TS z minimalno količino v kapljico DS za 4 minute.

OPOMBA: Vzorec bo ostal med izpostavljanjem raztopini DS skrčen.

V TEM ČASU PRIPRAVITE DVE 50-µl KAPLJICI RAZTOPINE WS (WS1, WS2), KOT JE PRIKAZANO NA DIAGRAMU PRIPOMOČKA HSV.

10. Prenesite vzorec (vzorci) v kapljico WS (WS1) za 4 minute.

OPOMBA: Vzorec (vzorci) bi se moral v raztopini WS znova razširiti na prvotno velikost v roku 2–3 minute.
11. Nato prenesite vzorec (vzorci) v drugo kapljico WS (WS2) za 4 minute.
12. Prenesite segrete OOCITE v predhodno ekvilibrirano gojišče za kulture z dodanimi 20 % (v/v) beljakovin ali 12 mg/ml za obnavljanje (2–3 ure, da omogočite ponovni nastanek vretena) pred nadaljnjimi manipulacijami.

Na voljo sta dve možnosti za segrete EMBRIE:

- a) Za takojšnji prenos do bolnika: prenos EMBRIEV v predhodno ekvilibrirani »prenosni« medij, ki vsebuje 20 % (v/v) dodatka beljakovin ali 12 mg/ml.
- b) Za nadaljnje kulture: prenos EMBRIEV v predhodno ekvilibrirano gojišče za kulture, ki vsebuje 20 % (v/v) dodatka beljakovin ali 12 mg/ml za 4-urno obdobje obnove. Po obdobju obnove prenesite EMBRIE v gojišče za kulture z 20 % (v/v) dodatka beljakovin in ustrezno inkubirajte, dokler ni dosežena zelena razvojna stopnja za prenos v bolnika.

OPOMBA: Dobljene oocyte je treba oploditi z uporabo ICSI za optimalno oploditev po vitifikaciji.

ZA SEGREVANJE PRIPOMOČKA CRYOLOCK™ KOT NOSILCA:

POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Sterilna 4-kanalna posoda ali majhne sterilne petrijevke (35 X 10 mm ali enakovredno)

- Rokavice za enkratno uporabo

- Prenosne pipete

- Štoparica ali časovnik

- Rezervoar tekočega dušika

- Tekoči dušik

- Gojišče za kulture z beljakovinami, predhodno ekvilibrirano na 37 °C v inkubatorju CO₂ pred postopkom odtajanja

- 37 °C inkubator brez CO₂ ali grelna mizica

- Klešče

NAVODILA ZA UPORABO

Komponente kompleta Vit Kit-Thaw (na uporabo)

- 1 ml raztopine Thawing Solution-TS
- 50 µl raztopine Dilution Solution-DS
- 100 µl raztopine Washing Solution-WS

PROTOKOL SEGREVANJA

OPOMBA: Koraki segrevanja vključujejo potapljanje pripomočka v 37 °C TS ter nato redčenje in splakovanje v DS oziroma WS pri sobni temperaturi

1. Priprava posode za odtajanje (kot je prikazano v diagramu pripomočka Cryolock, slika 1):
 - Pri 37 °C: Aseptično razdelite minimalno količino 1 ml raztopine TS in segrejte na 37 °C v inkubatorju brez CO₂ ali na grelni mizici vsaj 30 minut pred začetkom postopka segrevanja.

2. Vzemite vzorec (vzorci) Cryolock, ki jih boste segrevali, in hitro prenesite iz vsebnika LN₂ v napolnjeni nosilni rezervoar LN₂, pripravljen za postopek segrevanja.

3. Postavite iz LN₂ napolnjen nosilni rezervoar v neposredno bližino delovnega območja in mizice mikroskopa, da boste lahko nato izvedli hitro manipulacijo iz rezervoarja v TS.

4. Odstranite posodo TS iz 37 °C inkubatorja ali z grelne mizice in jo namestite v fokus na vrh mizice mikroskopa.

5. S kleščami držite zgornji konec glavnega dela pripomočka Cryolock z identifikacijsko nalepko obrnjeno navzgor.
Možnost A: Hitro in nežno odstranite pokrovček pod LN₂, tako da vrtite dele do sprostitve.
Možnost B: Hitro vzemite pripomoček Cryolock iz LN₂, nato pa hitro odstranite pokrovček z nežnim sukanjem.
OPOMBA: Laboratorij mora slediti lastnim postopkom in protokolom. Možnost A ni odobrena za uporabo v ZDA.
 6. Takoj potopite vbočeno konico pripomočka Cryolock z navzgor obrnjenim vzorcem v 37 °C TS. Med opazovanjem pod mikroskopom nežno premikajte Cryolock, dokler se vzorec (vzorci) ne sprostijo s konice.
 7. Pustite vzorec (vzorci) skupno 1 minuto v TS.
 8. Trideset (30) sekund po začetni potopitvi nežno nakapljajte vzorec (vzorci), če plava, in ga vstavite na dno raztopine TS.
Korake 9–12 je treba izvesti pri sobni temperaturi (22–27 °C).
 - Pri sobni temperaturi: Aseptično razdelite eno (1) 50 µl kapljico raztopine DS na sterilno petrijevko (glejte diagram Cryolock, slika 2).
 9. Prenesite vzorec (vzorci) v raztopino DS za 4 minute. Nežno nakapljajte vzorce enkrat, da zagotovite popolno izpiranje v raztopini DS.
OPOMBA: Vzorec bo ostal med izpostavljanjem raztopini DS skrčen.
 10. V 4 minutah izpostavljenosti v raztopini DS aseptično razdelite dve (2) 50 µl kapljici raztopine WS (WS1, WS2), kot kaže diagram.
 11. Nemoteno prenesite vzorec (vzorci) v WS1 in nato v WS2, vsako za 4 minute.
 - OPOMBA: Vzorec (vzorci) bi se moral v raztopini WS znova razširiti na prvotno velikost v roku 2–3 minute.
 12. Prenesite segrete OOCITE v predhodno ekvilibrirano gojišče za kulture z dodanimi 20 % (v/v) beljakovin ali 12 mg/ml za obnavljanje (2–3 ure, da omogočite ponovni nastanek vretena) pred nadaljnjimi manipulacijami.
- Na voljo sta dve možnosti za segrete EMBRIE:
- a) Za takojšnji prenos do bolnika: prenos EMBRIEV v predhodno ekvilibrirani »prenosni« medij, ki vsebuje 20 % (v/v) dodatka beljakovin ali 12 mg/ml.
 - b) Za nadaljnje kulture: prenos EMBRIEV v predhodno ekvilibrirano gojišče za kulture, ki vsebuje 20 % (v/v) dodatka beljakovin ali 12 mg/ml za 4-urno obdobje obnovitve. Po obdobju obnovitve prenesite EMBRIE v gojišče za kulture z 10 % (v/v) dodatka beljakovin in ustrezno inkubirajte, dokler ni dosežena zelena razvojna stopnja za prenos v bolnika.
- Dodatne podrobnosti o uporabi teh izdelkov določajo notranji laboratorijski postopki in protokoli vsakega laboratorija, ki so bili posebej razviti in optimizirani za zadevni medicinski program.

NAVODILA ZA SHRANJEVANJE IN STABILNOST

Neodprte vialje shranjujte v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C. Če shranjujete po navodilih, so kompleti raztopin Vitrification Thaw stabilni do izteka roka uporabnosti, ki je naveden na nalepki na viali.

Ko vsebnike odprete, medija ne uporabljajte več kot osem (8) tednov.

Ker izdelek vsebuje materiale človeških virov, se med hrambo lahko razvijejo določeni delci. Za to vrsto delcev ni znano, da bi vplivala na učinkovitost izdelka.

PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA

Ta pripomoček sme uporabljati samo osebje, ki je usposobljeno za postopke asistiranje reprodukcije. Ti postopki vključujejo predvideno uporabo, za katero je ta pripomoček zasnovan.

Ustanova, v kateri dela uporabnik tega pripomočka, je odgovorna za vzdrževanje sledljivosti izdelka in mora upoštevati nacionalne predpise glede sledljivosti, kjer je to ustrezno.

Ne uporabljajte vial z raztopino, na kateri so znaki poškodb, puščanja, delcev, motnosti ali če se je spremenila barva. Izdelek zavrzite skladno z veljavnimi predpisi.

Za preprečitev kontaminacije morate z izdelkom ravnati z aseptičnimi tehnikami.

Trenutno raziskovalna literatura kaže, da dolgoročni učinki vitifikacije na oocite in embrie ostajajo neznani.

Ne uporabite nobene steklenice, če je njena sterilna embalaža poškodovana.

EU: Standardni ukrepi za preprečevanje okužb, ki izhajajo iz uporabe medicinskih izdelkov, pripravljenih iz človeške krvi ali plazme, vključujejo selekcijo darovalcev, presejanje posameznih darovanih bioloških materialov in združene plazme za specifične označevalce okužbe in vključitev učinkovitih proizvodnih korakov za inaktivacijo/odstranitev virusov. Kljub temu pri uporabi medicinskih izdelkov, pripravljenih iz človeške krvi ali plazme, ni mogoče popolnoma izključiti prenosa povzročiteljev kužnih bolezni. To velja tudi za viruse, ki so še neznani ali so se začeli širiti pred kratkim, in druge patogene. O dokazanih prenosih virusov z albuminom, proizvedenim skladno s specifikacijami Evropske farmakopeje in uveljavljenimi postopki, ni nobenih poročil. Zelo priporočljivo je, da se ob vsaki uporabi gojišč proizvajalca Irvine Scientific, LLC, Reproductive Media Products pri bolniku zapiše ime in serijska številka izdelka, da se ohrani povezava med bolnikom in serijo izdelka.

ZDA: Ta izdelek vsebuje humani serumski albumin (HSA). Izhodni material človeškega izvora, ki se uporablja pri proizvodnji tega izdelka, je bil testiran z uporabo kompletov, potrjenih s strani FDA; testi so pokazali, da ni reaktiven na protitelesa proti hepatitisu C (HCV) in na protitelesa proti virusu humane imunске pomanjkljivosti (HIV). Vendar nobena testna metoda ne more popolnoma zagotoviti, da izdelki, pridobljeni iz človeških virov, niso kužni. Pri ravnanju z vsemi materiali človeškega izvora upoštevajte možno tveganje prenosa okužbe, tj. uporabljajte univerzalne previdnostne ukrepe. Pri darovalcih izvornega materiala je bilo opravljeno tudi presejanje za CJB.

KONTRAINDIKACIJE

Izdelek vsebuje gentamicin sulfat. Izvesti je treba ustrezne previdnostne ukrepe za zagotavljanje, da bolnik ne postane občutljiv za izbrani antibiotik.

This page intentionally left blank

FUJIFILM

