

Vitrification Freeze Kit (Vit Kit - Freeze)

with Gentamicin and DSS

Catalog No. 90133-SO Includes:

- Equilibration Solution - ES (white cap) 2 x 1 mL Vials
- Vitrification Solution - VS (blue cap) 2 x 1 mL Vials

Catalog No. 90133-DSOC Includes:

- Equilibration Solution - ES (white cap) 9 x 1 mL Vials
- Vitrification Solution - VS (blue cap) 9 x 1 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 paliglidzekļiem veicamām reproduktīvām procedūrām.

Voor geassisteerde voortplantingsprocedures.

Do procedur wspomagane go 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-proċeduri 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



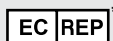
Manufacturer

RX Only

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.

Irvine Scientific, LLC

1830 E. Warner Ave., Santa Ana, California 92705 USA

Telephone: 1 949 261 7800 • 1 800 437 5706 • Fax: 1 949 261 6522 • www.irvinesci.com

PN 40695 Rev.26
Effective Date: 26-FEB-2025

Figure 1:

H = Modified HTF with HEPES (90126) + protein
ES = Equilibration Solution (90131)

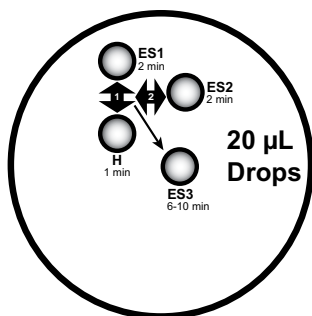


Figure 2:

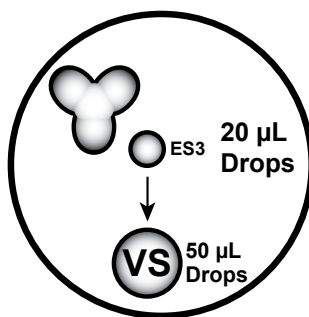


Figure 3:

Prepare CryoTip for loading

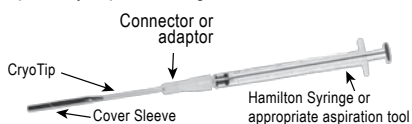


Figure 4:

Prepare HSV straw for loading

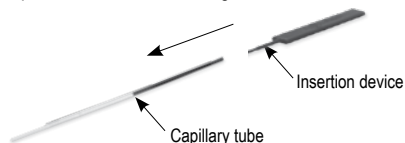


Figure 5:

Prepare Cryolock for loading



Figure 6:

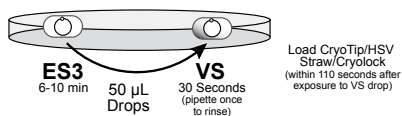


Figure 7a:

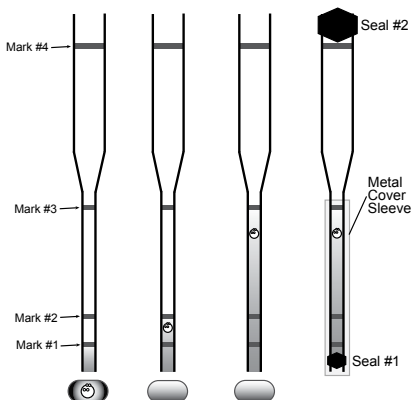


Figure 7b:

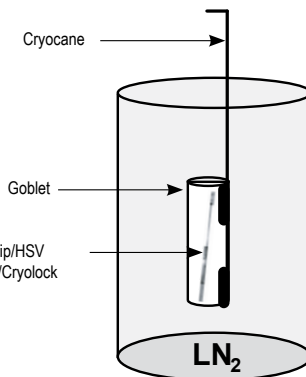
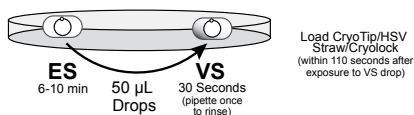


Figure 8:



EU CAUTION: For Professional Use Only.

INDICATIONS FOR USE

Vit Kit-Freeze is intended for use in assisted reproductive procedures for vitrification and storage of human oocytes (MII), pronuclear (PN) zygotes through day 3 cleavage stage embryos and blastocyst stage embryos. This kit is designed for use with CryoTip (Catalog #40709), and Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) for optimal recovery of specimens.

DEVICE DESCRIPTION

Equilibration Solution-ES is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate, 7.5% (v/v) of each DMSO and ethylene glycol and 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate, 15% (v/v) of each DMSO and ethylene glycol, 20% (v/v) DSS and 0.5 M sucrose.

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-Freeze for a final concentration of 10 mg/mL HSA and 4 mg/mL Dextran.

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

COMPOSITION

Salts & Ions

Sodium Chloride
Sodium Phosphate
Potassium Chloride
Magnesium Sulfate
Sodium Acetate
Calcium Chloride
Choline Chloride
Ferric Nitrate

Buffer

Sodium Bicarbonate
HEPES

pH Indicator

Phenol Red

Amino Acids

Arginine
Glycine
Histidine
Lysine

Proline
Tyrosine
Alanine
Aspartic Acid
Glutamic Acid
Isoleucine
Leucine
Methionine
Phenylalanine
Serine
Threonine
Tryptophan
Valine
Hydroxyproline
Cystine
Cysteine

Antioxidant

Glutathione

Other

Adenine Sulfate
Deoxyribose
Ribose
Guanine
Uracil
Xanthine
Thymine
Hypoxanthine
Adenosine

Vitamins And Minerals

Calciferol
Ascorbic Acid
Aminobenzoic Acid
Nicotinic Acid
Nicotinic Acid Amide
Pantothenic Acid
Riboflavin
Thiamine
Biotin

Pyridoxine
Sodium Bisulfite
Folic Acid
Alpha-Tocopherol

Antibiotics

Gentamicin Sulfate

Energy Substrates

Glucose
Inositol

Protein

Human Serum Albumin

Cryoprotectant

Dextran
Sucrose
Ethylene Glycol
Dimethylsulfoxide

Water

WFI Quality

QUALITY ASSURANCE

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

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

Solutions and CryoTips.

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.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (Catalog #40709) or HSV Straw (Catalog #25246-25251) or Cryolock™ (Catalog #CL R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Connector (Catalog #40736) or other adaptor
- Sterile petri dishes (50 X 9 mm, Falcon 351006 or equivalent)
- Cryotubes (4.5 mL) or gobelets and cryocanes
- Modified HTF - HEPES (Catalog #90126) culture medium supplemented with protein
- Hyaluronidase (Catalog #90101)
- Disposable gloves
- Hamilton GASTIGHT® Syringe (50 μ L, Catalog #80901) or other aspiration tool
- Transfer pipettes (pulled glass pipettes or micropipette tips with an inner tip diameter of $\sim 200\mu$ m)
- Tweezers or forceps
- Impulse Heat Sealer
- SYMS Sealer for HSV Straw
- 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)

DIRECTIONS FOR USE

Vit Kit-Freeze component requirements (per application):

- Equilibration Solution (ES):
60 µL for Oocyte Vitrification Protocol
Or
50 µL for Embryo Vitrification Protocol
- Vitrification Solution (VS):
50 µL for Vitrification Protocol
- 1 CryoTip or HSV Straw or Cryolock (stores up to 2 specimens)
- 1 Connector

VITRIFICATION PROTOCOL:

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 equilibration in ES and VS solutions.

1. Bring the quantity to be used of ES and VS to room temperature (20-27°C). **NOTE:** Avoid bringing the entire vials of ES and VS to room temperature repeatedly when a partial 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. Modified HTF (HEPES) with protein is also required for oocyte vitrification protocol.
2. Fill the liquid nitrogen reservoir with liquid nitrogen (sufficient to achieve a depth of 4 inches or to completely submerge cryotube on cane) and place close to microscope. Attach a cryotube or goblet (uncapped) to the bottom clamp of a cryocane and submerge in the liquid nitrogen in preparation for storage of the vitrified specimens.
3. Determine the number of specimens to be vitrified.
4. Label each sterile petri dish (or lid) and Cryo storage device with necessary information.
5. Gently invert each vial of ES and VS twice to mix contents before use.
6. Prepare dish with droplets of solutions for Vitrification Procedure as follows:

A. OOCYTE (MII) Vitrification Protocol:

NOTE 1: Retrieved oocytes are to be denuded with Hyaluronidase to confirm they are MII.

NOTE 2: Refer to Section B for embryo vitrification protocol.

1. Aseptically dispense 20 µL drop of culture medium, Modified HTF - HEPES with protein, and ES in close proximity on an inverted lid of sterile petri dish as shown in Figure 1, and place the dish on the microscope stage:
 - one- 20 µL drop of Modified HTF (HEPES with protein)
 - three- 20 µL drops (60 µL total) of ES (ES1, ES2, ES3)
2. Remove the culture dish containing MII oocytes from the incubator and check the quality of the specimens under microscope. Where possible, select only the best quality MII stage oocyte(s).
CAUTION: Minimize the exposure of the specimen(s) to light during equilibration in the H, ES and VS drops.
3. Transfer the oocyte (up to 2 at a time) with minimal volume of medium from the culture dish (in incubator) into the 20 µL drop of **H** for one minute.
4. Merge the drop of H to ES1 (See Fig. 1, arrow 1) with the tip of the transfer pipette and allow spontaneous mixing of the two solutions to occur for 2 minutes.
5. Then merge the drop of ES2 (arrow 2) to the previously merged drops and leave for 2 minutes.
6. Transfer the oocyte(s) with minimal volume of solution from merged drop to ES3 drop for 6-10 minutes. **Note:** equilibration of oocyte(s) in ES3 is complete when the thickness of the zona pellucida and perivitelline space is equal. The oocyte(s) will settle to the bottom of the drop within 3 minutes.
7. During the equilibration time in ES3:
Aseptically dispense one (1) 50 µL drop of VS 2 minutes prior to complete equilibration and prepare the CryoTip (Fig. 3), HSV Straw (Fig. 4), or Cryolock (Fig. 5) for loading:
NOTE: Carefully examine the vitrification device and tip before starting procedure
 - CryoTip: connect to the Hamilton syringe or appropriate aspiration tool using a connector or adaptor to assure a tight seal. **NOTE:** Keep the metal cover sleeve over the fine pulled tip to protect it until ready to load specimens.
 - HSV Straw: connect the longer end of the blue plastic insertion device to the colored end of the handling rod.
 - Cryolock: detach the cap.
8. The following steps (9-13) should be completed in 80-110 seconds. **CAUTION:** Exposure of specimens to VS should be limited to prevent cytotoxicity. Specimen(s) tend to float in VS, so adjust the focus through the microscope to maintain continuous visualization during exposure and keep the tip of the transfer pipette nearby to assure rapid transfer between VS drops. Refer to Figure 6.
9. After equilibration in ES is complete, draw up some ES into the transfer pipet and transfer the specimen(s) with minimal volume from the drop of ES into the drop of VS for 30 seconds.
10. Load and heat seal the CryoTip as follows (See Figure 7a):
 - Slide the metal cover sleeve up along the CryoTip to expose the fine fragile tip end.
 - Handling the CryoTip and Hamilton syringe while observing under the microscope, carefully aspirate a small volume of VS to the Mark #1 on the CryoTip.
 - Continue observation under the microscope and gently aspirate the specimen with VS to the Mark #2 on the CryoTip.
 - Now observe the CryoTip directly and aspirate more VS to the Mark #3.
 - Specimen must be located between Mark #2 and Mark #3.

- Heat seal (Seal #1) the CryoTip on (or just below) Mark #1, and slide the cover sleeve back down to cover and protect the fine fragile tip.
- Carefully remove the CryoTip from the aspiration tool and adaptor and then heat seal (Seal #2) at the thick end of the CryoTip above the Mark #4.
- Plunge the covered CryoTip directly into liquid nitrogen (cooling at a rate of $-12,000^{\circ}\text{C/min}$) (See Figure 7b).

Load and seal the HSV straw as follows:

- Using a micropipette, carefully deposit the specimen(s) into the gutter of the capillary rod at 1 mm from the end. The drop holding the specimen(s) must be under 0.5 μL . Maximum of 2 oocytes or embryos for each capillary rod.
- Immediately place the capillary rod and handler into the straw and push until the rectangular portion of the handler comes in contact with the flared end of the straw.
- Slightly pinch the straw between your thumb and finger and remove the insertion device.
- While still holding the straw in place, seal the open end using a SYMS sealer.
- Hold the straw using tweezers in the area of the handling rod.
- Quickly plunge the entire straw into LN_2 vertically. Gently stir the straw in LN_2 for a few seconds so as to avoid formation of an isolating air bubble layer around the straw.

Load the Cryolock as follows:

- Using a micropipette, carefully load a maximum of 2 specimen(s) on the concave surface of the tip (same side of Cryolock logo) about 3 mm (1/8") from the edge of tip (use black mark as a reference), removing any excess of cryoprotectant solution leaving as minimum volume of vitrification media as possible ($\leq 1\ \mu\text{L}$).
 - Option A: Immediately and before immersing the Cryolock into LN_2 , carefully insert the tip into the cap twisting tightly until secure
 - Option B: Immediately immerse tip and cap under LN_2 . Wait for bubbling to stop to allow for equilibration. Carefully insert the tip into the cap, twisting tightly enough until secure.
- NOTE: Option B not cleared for use in the U.S.
- Quickly plunge Cryolock into liquid nitrogen.
- NOTE: Always store the Cryolock with the cap facing down.

11. Place the vitrified CryoTip, HSV straw or Cryolock into the submerged LN_2 filled cryotube or goblet (on the cryocane). Cap the cryotube (or goblet) or attach up-side-down with another uncapped cryotube in order to secure the vitrified device in liquid nitrogen.
12. Move the LN_2 reservoir close to the LN_2 cryo-freezer and transfer the cryocane with contents to the cryo-freezer for long-term storage.

B. EMBRYOS (PN to Blastocyst)

Vitrification Protocol:

1. Aseptically dispense one- 50 μL drop of ES on an inverted lid of Petri dish.
2. Remove the culture dish with embryo(s) from the incubator and check the quality of the specimen(s) under microscope. Where possible, select only the best quality embryo(s) for vitrification.
3. Aseptically transfer the specimen (up to two at one time) with a minimal volume of medium from the culture dish to the drop of ES and start the timer.
Embryos should equilibrate in the ES drop slowly by free-fall for 6-10 minutes.
Note: The specimen will shrink and then gradually return to its original size, which indicates that the equilibration is complete.
CAUTION: Minimize the exposure of specimen(s) to light during equilibration in ES and VS drops.
4. During this equilibration time in ES:
 - set up one-50 μL drop of VS solution as shown in Fig 8 and prepare the CryoTip, HSV Straw, or Cryolock for loading.

Follow protocol as written above (Section A - Oocyte [MI] Vitrification Protocol) from steps 9 through 12 for exposure to VS solutions, loading of CryoTip, HSV Straw, or Cryolock, plunging in LN_2 and long term storage.

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 Freeze 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.

As an added precaution during the preparation procedure, we recommend that each Cryotip be carefully examined when taken out of the package. Prior to use, the CryoTips should be examined under a suitable magnification (40x power) for possible damage (such as tip breakages or cracks) that may have occurred during transport.

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.

EU-VORSICHTSHINWEIS: Nur für den professionellen Einsatz.

INDIKATIONEN

Vit Kit-Freeze ist für die Verwendung bei assistierten Reproduktionsverfahren zur Vitrifikation und Lagerung menschlicher Oozyten (MI) und Zygoten im Vorkernstadium (PN) bis zu Embryos im Teilungsstadium am Tag 3 und Blastozystenstadium vorgesehen. Dieses Kit ist zur Verwendung zusammen mit dem CryoTip (Bestell-Nr. 40709) und dem Vitrifikations-Auftaukit (Vit Kit-Thaw) für eine optimale Probengewinnung vorgesehen.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Equilibration Solution-ES ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium 199 und enthält Gentamicinsulfat, jeweils 7,5 % (v/v) DMSO und Ethylenglykol und 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium 199 und enthält Gentamicinsulfat, jeweils 15 % (v/v) DMSO und Ethylenglykol, 20 % (v/v) DSS und 0,5 M Saccharose.

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-Freeze bei einer Endkonzentration von 10 mg/ml HSA und 4 mg/ml Dextran verwendet.

Diese beiden Lösungen werden nacheinander gemäß dem schrittweisen Protokoll der Vitrifikation in Mikrotropfen eingesetzt.

ZUSAMMENSETZUNG

Salze und Ionen

Natriumchlorid
Natriumphosphat
Kaliumchlorid
Magnesiumsulfat
Natriumacetat
Calciumchlorid
Cholinchlorid
Eisennitrat
Threonin
Tryptophan
Valin
Hydroxyprolin
Cystin
Cystein

Puffer

Natriumbicarbonat
HEPES

pH-Indikator

Phenolrot

Aminosäuren

Arginin
Glycin
Histidin
Lysin

Prolin
Tyrosin
Alanin
Asparaginsäure
Glutaminsäure
Isoleucin
Leucin
Methionin
Phenylalanin
Serin
Threonin
Tryptophan
Valin
Hydroxyprolin
Cystin
Cystein

Antioxidans

Glutathion

Andere

Adeninsulfat
Desoxyribose
Ribose
Guanin
Uracil
Xanthin
Thymin
Hypoxanthin
Adenosin

Vitamine und Mineralien

Calciferol
Ascorbinsäure
Aminobenzoesäure
Nikotinsäure
Nikotinsäureamid
Pantothensäure
Riboflavin
Thiamin
Biotin

Pyridoxin
Natriumhydrogensulfid
Folsäure
Alpha-Tocopherol

Antibiotika

Gentamicinsulfat

Energiesubstrate

Glukose
Inositol

Protein

Humanalbumin

Cryoprotektor

Dextran
Saccharose
Ethylenglykol
Dimethylsulfoxid

Wasser

Wasser für
Injektionszwecke (WFI)

QUALITÄTSSICHERUNG

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

Jede Charge von Vit Kit-Freeze durchläuft folgende Tests:

Lösungen und CryoTips:

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.

BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND:

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (Bestell-Nr. 40709) oder HSV Straw (Bestell-Nr. 25246-25251) oder Cryolock™ (Bestell-Nr. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Verbindungsstück (Bestell-Nr. 40736) oder anderer Adapter
- Sterile Petrischalen (50 X 9 mm, Falcon 351006 oder gleichwertig)
- Kryoröhrchen (4,5 ml) oder Becher und „Cryocanes“ (Kryoröhrchen-Halter)
- Modified HTF – HEPES (Bestell-Nr. 90126), proteinhaltiges Kulturmedium
- Hyaluronidase (Bestell-Nr. 90101)
- Einmalhandschuhe
- Hamilton GASTIGHT®-Spritze (50 µl, Bestell-Nr. 80901) oder anderes Aspirationsinstrument
- Transferpipetten (Pipetten aus gezogenem Glas oder Mikropipetten-Spitzen mit einem Innendurchmesser von ca. 200 µm)
- Pinzetten
- Impuls-Heißsiegelgerät
- SYMS-Siegelgerät für HSV Straw
- 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)

GEBRAUCHSANWEISUNG

Vit Kit-Freeze Komponentenbedarf (pro Anwendung):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl für Oozyten-Vitrifikationsprotokoll
oder
50 µl für Embryo-Vitrifikationsprotokoll
- Vitrification Solution (VS):
50 µl für Vitrifikationsprotokoll
- 1 CryoTip oder HSV Straw oder Cryolock (Aufbewahrung von bis zu 2 Proben)
- 1 Verbindungsstück

VITRIFIKATIONSPROTOKOLL:

HINWEIS: Die Verfahren sind bei Raumtemperatur (20–27 °C) durchzuführen. KEINEN erwärmten Objektträger bei den folgenden Verfahren verwenden. **VORSICHT:** Die Proben bei einer Äquilibration in ES- und VS-Lösungen so weit wie möglich vor Lichtexposition schützen.

1. Die benötigte Menge ES und VS auf Raumtemperatur (20–27 °C) bringen. **HINWEIS:** Es sollte vermieden werden, die Fläschchen mit der gesamten Menge an ES und VS wiederholt auf Raumtemperatur zu bringen, wenn jeweils nur ein Teil 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. Proteinhaltiges Modified HTF (HEPES) ist auch für das Oozyten-Vitrifikationsprotokoll erforderlich.
2. Den Flüssigstickstoffbehälter mit Flüssigstickstoff füllen (so viel, dass eine Tiefe von 4 Zoll (10 cm) erreicht wird oder dass die Kryoröhrchen am Cryocane vollständig eingetaucht werden können) und neben dem Mikroskop aufstellen. Ein Kryoröhrchen oder einen Becher (ohne Deckel) an der unteren Klemme eines Cryocanes befestigen und in Flüssigstickstoff tauchen, um die Lagerung der vitrifizierten Proben vorzubereiten.
3. Die Anzahl der zu vitrifizierenden Proben ermitteln.
4. Jede sterile Petrischale (bzw. jeden Deckel) und die Kryolagerungsvorrichtung mit den notwendigen Informationen beschriften.
5. Vor dem Gebrauch den Inhalt jedes Fläschchens mit ES und VS durch zweimaliges vorsichtiges Umdrehen mischen.
6. Die Schale mit Tröpfchen der Lösung für das Vitrifikationsverfahren wie folgt vorbereiten:

A. Vitrifikationsprotokoll für OOZYTEN (MII):

HINWEIS 1: Entnommene Oozyten müssen mit Hyaluronidase freigelegt werden, um zu bestätigen, dass es sich um MII handelt.

HINWEIS 2: Das Vitrifikationsprotokoll für Embryos ist Abschnitt B zu entnehmen.

1. Unter Einsatz einer aseptischen Technik jeweils einen 20-µl-Tropfen Kulturmedium, proteinhaltiges Modified HTF – HEPES und ES dicht nebeneinander auf den umgedrehten Deckel einer sterilen Petrischale geben, wie in Abbildung 1 dargestellt, und die Schale auf den Objektträger stellen:
 - Ein 20-µl-Tropfen Modified HTF (proteinhaltiges HEPES)
 - Drei 20-µl-Tropfen (insgesamt 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Die Kulturschale mit den MII-Oozyten aus dem Inkubator entnehmen und die Qualität der Proben unter dem Mikroskop prüfen. Möglichst nur die hochwertigste(n) Oozyte(n) im MII-Stadium auswählen.
VORSICHT: Die Probe(n) während der Äquilibration in H-, ES- und VS-Tropfen so weit wie möglich vor Lichtexposition schützen.
3. Die Oozyte(n) (bis zu 2 gleichzeitig) mit einem minimalen Medienvolumen aus der Kulturschale (im Inkubator) auf den 20-µl-Tropfen H überführen und eine Minute warten.
4. Den H-Tropfen mithilfe der Spitze der Transferpipette zum ES1 geben (siehe Abb. 1, Pfeil 1) und 2 Minuten warten, um eine spontane Mischung beider Lösungen zu ermöglichen.
5. Dann den Tropfen ES2 (Pfeil 2) zu den zuvor gemischten Tropfen geben und 2 Minuten warten.
6. Die Oozyte(n) mit minimalem Lösungsvolumen aus dem gemischten Tropfen auf den ES3-Tropfen überführen und 6–10 Minuten warten. **Hinweis:** Die Äquilibration der Oozyte(n) in ES3 ist beendet, wenn die Dicke von Zona pellucida und perivitellinem Spalt übereinstimmen. Oozyten setzen sich im Tropfen innerhalb von 3 Minuten nach unten ab.
7. Während der Äquilibrationszeit in ES3:
Unter Einsatz einer aseptischen Technik 2 Minuten vor Abschluss der Äquilibration einen (1) 50-µl-Tropfen VS abgeben und den CryoTip (Abb. 3), HSV Straw (Abb. 4) oder Cryolock (Abb. 5) zum Beladen vorbereiten:
HINWEIS: Das Vitrifikationsgerät und die Spitze vor Start des Verfahrens sorgfältig prüfen.
 - CryoTip: Mithilfe eines Verbindungsstücks oder eines Adapters auf eine Hamilton-Spritze oder ein geeignetes Aspirationsinstrument aufsetzen, um eine zuverlässige Abdichtung sicherzustellen. **HINWEIS:** Die Metallschutzhülle über der feinen gezogenen Spitze belassen, um sie bis zum Laden der Proben zu schützen.
 - HSV Straw: Das längere Ende der blauen Kunststoff-Einführhilfe mit dem farbigen Ende des Handhabungsstabs verbinden.
 - Cryolock: Die Kappe abnehmen.
8. Folgende Schritte (9–13) sind innerhalb von 80–110 Sekunden durchzuführen. **VORSICHT:** Die Proben sollten VS nur begrenzt ausgesetzt werden, um eine Zytotoxizität zu vermeiden. Proben neigen dazu, in VS zu schweben; daher sollte das Mikroskop so fokussiert werden, dass während der Exposition eine kontinuierliche Visualisierung aufrechterhalten bleibt. Außerdem die Spitze der Transferpipette in der Nähe halten, um einen schnellen Transfer zwischen den VS-Tropfen zu gewährleisten. Siehe Abbildung 6.

9. Nach Abschluss der Äquilibration in ES etwas ES in die Transferpipette aufziehen und die Probe(n) für einen Zeitraum von 30 Sekunden mit einem minimalem Volumen vom ES-Tropfen auf den VS-Tropfen überführen.
10. Den CryoTip wie folgt beladen und heißversiegeln (siehe Abbildung 7a):
 - Die Metallschutzhülle entlang des CryoTip nach oben schieben, um das feine, empfindliche Ende der Spitze freizulegen.
 - Den CryoTip und die Hamilton-Spritze unter dem Mikroskop beobachten und vorsichtig eine kleine Menge VS bis zur Markierung Nr. 1 auf dem CryoTip aspirieren.
 - Die Beobachtung unter dem Mikroskop fortsetzen und vorsichtig die Probe mit VS bis zur Markierung Nr. 2 auf dem CryoTip aspirieren.
 - Jetzt den CryoTip direkt beobachten und eine weitere Menge VS bis zur Markierung Nr. 3 aspirieren.
 - Die Probe muss sich zwischen Markierung Nr. 2 und Markierung Nr. 3 befinden.
 - Den CryoTip an (oder knapp unterhalb) der Markierung Nr. 1 heißversiegeln (Versiegelung Nr. 1) und zum Schutz der feinen, empfindlichen Spitze die Schutzhülle wieder nach unten schieben.
 - Den CryoTip vorsichtig vom Aspirationsinstrument und Adapter entfernen und dann am breiten Ende des CryoTip über der Markierung Nr. 4 heißversiegeln (Versiegelung Nr. 2).
 - Den abgedeckten CryoTip direkt in Flüssigstickstoff tauchen (mit einer Kühlgeschwindigkeit von $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C/Min.}$ abkühlen) (siehe Abbildung 7b).
- Den HSV Straw wie folgt beladen und versiegeln:
 - Die Proben mit einer Mikropipette vorsichtig 1 mm vom Ende entfernt auf die Rinne des Kapillarstabs aufbringen. Das Volumen des Tropfens mit der (den) Probe(n) muss weniger als $0,5\text{ }\mu\text{l}$ betragen. Maximal 2 Oozyten oder Embryos pro Kapillarstab.
 - Den Kapillarstab und die Handhabungsvorrichtung unverzüglich in den Straw einführen und solange schieben, bis der rechteckige Teil der Handhabungsvorrichtung mit dem ausgestellten Ende des Straws in Kontakt kommt.
 - Den Straw zwischen Daumen und Zeigefinger leicht zusammendrücken und die Einführhilfe entfernen.
 - Den Straw festhalten und das offene Ende mit einem SYMS-Siegelgerät versiegeln.
 - Den Straw mit einer Pinzette im Bereich des Handhabungsstabs halten.
 - Den gesamten Straw schnell senkrecht in LN_2 eintauchen. Den Straw vorsichtig für einige Sekunden in LN_2 bewegen, um zu vermeiden, dass sich eine isolierende Luftschicht um den Straw herum bildet.
- Den Cryolock wie folgt beladen:
 - Mit einer Mikropipette vorsichtig maximal 2 Proben etwa 3 mm ($1/8''$) von der Kante der Spitze entfernt (schwarze Markierung als Referenz verwenden) auf die konkave Oberfläche der Spitze (die Seite, auf der sich das Cryolock-Logo befindet) laden. Hierzu alle überschüssigen Reste an Kälteschutzlösung entfernen und eine möglichst geringe Menge an Vitrifikationsmedium beibehalten ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$).
 - Option A: Unverzüglich und vor dem Eintauchen des Cryolock in LN_2 vorsichtig die Spitze in die Kappe setzen und festdrehen, bis sie fest sitzt.
 - Option B: Spitze und Kappe unverzüglich in LN_2 eintauchen. Warten, bis sich keine Blasen mehr bilden, um eine Äquilibration zu ermöglichen. Die Spitze in die Kappe setzen und fest genug drehen, bis sie fest sitzt.
- HINWEIS: Anwendung von Option B ist in den USA nicht zugelassen.
- Den Cryolock schnell in Flüssigstickstoff eintauchen.
- HINWEIS: Den Cryolock immer mit nach unten gerichteter Kappe aufbewahren.
11. Den vitrifizierten CryoTip, HSV Straw oder Cryolock im eingetauchten, mit LN_2 gefüllten Kryoröhrchen oder im Becher (am Cryocane) platzieren. Das Kryoröhrchen (oder den Becher) mit dem Deckel verschließen oder umdrehen und mit einem anderen deckellosen Kryoröhrchen befestigen, um das vitrifizierte Gerät in Flüssigstickstoff zu sichern.
12. Den LN_2 -Behälter neben dem LN_2 -Kryogefrierer aufstellen und den Cryocane mitsamt Inhalt für eine langfristige Aufbewahrung der Proben in den Kryogefrierer überführen.

B. EMBRYOS (PN bis Blastozysten):

Vitrifikationsprotokoll:

1. Unter Einsatz einer aseptischen Technik einen $50\text{-}\mu\text{l}$ -Tropfen ES auf den umgedrehten Deckel einer Petrischale geben.
2. Die Kulturschale mit dem (den) Embryo(s) aus dem Inkubator entnehmen und die Qualität der Probe(n) unter dem Mikroskop prüfen. Möglichst nur den (die) hochwertigsten Embryo(s) für die Vitrifikation auswählen.
3. Die Probe(n) (bis zu zwei gleichzeitig) vorsichtig mit einem minimalen Medienvolumen von der Kulturschale auf den Tropfen ES überführen und den Zeitgeber starten.
Embryos sollten im ES-Tropfen langsam durch freien Fall 6–10 Minuten lang äquilbrieren.
Hinweis: Die Proben schrumpfen und kehren dann schrittweise wieder zur ursprünglichen Größe zurück. Dies weist darauf hin, dass die Äquilibration abgeschlossen ist.
VORSICHT: Proben bei einer Äquilibration in ES- und VS-Tropfen so weit wie möglich vor Lichtexposition schützen.
4. Während dieser Äquilibrationszeit in ES:
 - Wie in Abb. 8 dargestellt einen $50\text{-}\mu\text{l}$ -Tropfen VS-Lösung bereitstellen und den CryoTip, HSV Straw oder Cryolock zum Beladen vorbereiten.

Das oben beschriebene Protokoll (Abschnitt A – Vitrifikationsprotokoll für Oozyten [MI]) von Schritt 9 bis 12 zur Exposition in VS-Lösungen, dem Beladen von CryoTip, HSV Straw oder Cryolock, dem Eintauchen in LN_2 und zur Langzeitlagerung befolgen.

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 Fläschchen bei 2 °C bis 8 °C gekühlt lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Lösungen des Vitrifikations-Einfrierkits bis zu dem auf der Kennzeichnung der Fläschchen 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.

Als zusätzliche Vorsichtsmaßnahme während der Vorbereitung ist zu empfehlen, jeden CryoTip nach Entnahme aus der Verpackung einer gründlichen Sichtprüfung zu unterziehen. Vor Gebrauch sollten die CryoTips unter geeigneter (40-facher) Vergrößerung auf mögliche Schäden (z. B. Spitzenbrüche oder Risse) untersucht werden, die beim Transport aufgetreten sein könnten.

Fläschchen 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 Verabreichung 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-Freeze è indicato per l'uso nelle tecniche di riproduzione assistita per la vitrificazione e la conservazione di ovociti umani (MI), embrioni tra lo stadio di zigoti pronucleati (PN) e la fase di clivaggio al giorno 3, ed embrioni allo stadio di blastocisti. Questo kit è destinato all'uso con CryoTip (n. di catalogo 40709) e il kit Vitrification Thaw (Vit Kit-Thaw) per un recupero ottimale dei campioni.

DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

Equilibration Solution-ES è una soluzione tamponata con HEPES di Medium-199 contenente gentamicina solfato, 7,5% (v/v) ciascuno di DMSO e glicole etilenico, e 20% (v/v) di Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS è una soluzione tamponata con HEPES di Medium-199 contenente gentamicina solfato, 15% (v/v) ciascuno di DMSO e glicole etilenico, 20% (v/v) di DSS e 0,5 M di saccarosio.

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-Freeze per una concentrazione finale di 10 mg/ml di HSA e di 4 mg/ml di destrano.

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

COMPOSIZIONE

Sali e ioni

Cloruro di sodio
Fosfato di sodio
Cloruro di potassio
Solfato di magnesio
Acetato di sodio
Cloruro di calcio
Cloruro di colina
Nitrato ferrico

Tampone

Bicarbonato di sodio
HEPES

Indicatore di pH

Rosso fenolo

Aminoacidi

Arginina
Glicina
Istidina
Lisina

Prolina

Tirosina
Alanina
Acido aspartico
Acido glutammico
Isoleucina
Leucina
Metionina
Fenilalanina
Serina
Treonina
Tryptofano
Valina
Idrossiprolina
Cistina
Cisteina

Antiossidante

Glutazione

Altro

Solfato di adenina
Desossiribosio
Ribosio
Guanina
Uracile
Xantina
Timina
Ipoxantina
Adenosina
Vitamine e minerali
Calciferolo
Acido ascorbico
Acido aminobenzoico
Acido nicotinico
Ammide di acido nicotinico
Acido pantotenico
Riboflavina
Tiamina
Biotina

Piridossina
Bisolfato di sodio
Acido folico
Alfa-tocoferolo

Antibiotici

Gentamicina solfato

Substrati energetici

Glucosio
Inositolo

Proteina

Albumina sierica umana

Crioprotettore

Destrano
Saccarosio
Glicole etilenico
Dimetilsolfossido

Acqua

Qualità WFI
(Acqua per iniezioni)

GARANZIA DI QUALITÀ

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

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

Soluzioni e CryoTip.

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.

MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (n. di catalogo 40709) o paillette HSV (n. di catalogo 25246-25251) o Cryolock™ (n. di catalogo CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Connector (n. di catalogo 40736) o altro adattatore
- Piastre di Petri sterili (50 × 9 mm, Falcon 351006 o equivalenti)
- Crioprovette (4,5 ml) o goblet e supporti CryoCane
- Terreno di coltura HTF - HEPES modificato (n. di catalogo 90126) con integratore proteico
- l'aluronidasi (n. di catalogo 90101)
- Guanti monouso
- Siringa Hamilton GASTIGHT® (50 µl, n. di catalogo 80901) o altro dispositivo di aspirazione
- Pipette di trasferimento (pipette in vetro tirato o puntali per micropipetta con diametro interno del puntale di 200 µm circa)
- Pinzette o pinze
- Sigillatore a caldo a impulsi
- Sigillatore SYMS per paillette HSV
- 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)

ISTRUZIONI PER L'USO

Requisiti relativi ai componenti di Vit Kit-Freeze (per applicazione)

- Equilibration Solution (ES):
60 µl per il protocollo di vitrificazione degli ovociti
oppure
50 µl per il protocollo di vitrificazione degli embrioni
- Vitrification Solution (VS):
50 µl per il protocollo di vitrificazione
- 1 CryoTip, paillette HSV o Cryolock (permette di conservare fino a 2 campioni)
- 1 connettore

PROTOCOLLO DI VITRIFICAZIONE

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 l'equilibratura nelle soluzioni ES e VS.

1. Portare a temperatura ambiente (20-27 °C) la quantità di ES e VS da utilizzare. **NOTA** – Evitare di portare ripetutamente a temperatura ambiente interi flaconi di ES e VS quando è necessario usare solo una parte delle soluzioni. È preferibile prelevare la quantità da utilizzare e rimettere immediatamente i flaconi in frigorifero a 2-8 °C. Per il protocollo di vitrificazione degli ovociti è necessario anche HTF modificato (HEPES).
2. Riempire l'apposito serbatoio con azoto liquido (in quantità sufficiente per raggiungere una profondità di 4 pollici [10 cm] o per immergere completamente la crioprovetta su supporto) e collocarlo accanto al microscopio. Fissare una crioprovetta o un goblet (senza tappo) nell'alloggiamento inferiore di un supporto CryoCane e immergerlo nell'azoto liquido per prepararlo alla conservazione dei campioni vitrificati.
3. Determinare il numero di campioni da vitrificare.
4. Riportare le informazioni necessarie su ciascuna piastra di Petri (o coperchio) sterile e su ciascun dispositivo di crioconservazione.
5. Prima dell'uso, capovolgere delicatamente due volte i flaconi di ES e VS per mescolarne il contenuto.
6. Preparare la piastra con gocce di soluzione per la procedura di vitrificazione come descritto qui di seguito.

A. Protocollo di vitrificazione degli OVOCITI (MII)

NOTA 1 – Gli ovociti recuperati devono essere decumulati con ialuronidasi per confermare che si trovano allo stadio di MII.

NOTA 2 – Per il protocollo di vitrificazione degli embrioni, vedere la Sezione B.

1. Dispensare in modo asettico gocce da 20 µl di terreno di coltura, HTF - HEPES modificato, con integratore proteico e ES in prossimità sul coperchio capovolto di una piastra di Petri sterile come mostrato nella Figura 1, e collocare la piastra sul tavolino traslatore del microscopio:
 - una goccia da 20 µl di HTF modificato (HEPES con integratore proteico);
 - tre gocce da 20 µl (60 µl in totale) di ES (ES1, ES2, ES3).
2. Estrarre dall'incubatore la piastra di coltura contenente gli ovociti allo stadio di MII e verificare la qualità dei campioni al microscopio. Ove possibile, selezionare solo gli ovociti allo stadio di MII della migliore qualità.
ATTENZIONE – Ridurre al minimo l'esposizione dei campioni alla luce durante l'equilibratura nelle gocce di H, ES e VS.
3. Trasferire uno o più ovociti (fino a 2 alla volta), con un volume minimo di terreno, dalla piastra di coltura (nell'incubatore) alla goccia da 20 µl di H per un minuto.
4. Unire tra loro le gocce di H e ES1 (vedere la Figura 1, freccia 1) con la punta della pipetta di trasferimento e consentire la miscelazione spontanea delle due soluzioni per 2 minuti.
5. Unire quindi la goccia di ES2 (freccia 2) alle gocce unite in precedenza e lasciare riposare per 2 minuti.
6. Trasferire l'ovocita o gli ovociti, con un volume minimo di soluzione prodotta dall'unione delle gocce precedenti, alla goccia di ES3 per 6-10 minuti. **Nota** – L'equilibratura dell'ovocita o degli ovociti nella goccia di ES3 è completa quando lo spessore della zona pellucida è uguale a quello dello spazio perivitellino. Gli ovociti si sistemano sul fondo della goccia entro 3 minuti.
7. Durante il periodo di equilibratura in ES3:
dispensare in modo asettico una (1) goccia da 50 µl di VS 2 minuti prima dell'equilibratura completa e preparare il CryoTip (Fig. 3), la paillette HSV (Fig. 4) o il Cryolock (Fig. 5) per il caricamento:

NOTA – Prima di iniziare la procedura, esaminare attentamente il dispositivo di vitrificazione.

- CryoTip: collegarlo alla siringa Hamilton oppure a un appropriato dispositivo di aspirazione mediante un connettore o un adattatore per assicurare una chiusura ermetica. **NOTA** – Mantenere il coperchio metallico sopra la punta sottile in vetro tirato per proteggerla finché non si è pronti a caricare i campioni.
 - Paillette HSV: collegare l'estremità più lunga del dispositivo di inserimento in plastica all'estremità colorata dell'asta di manipolazione.
 - Cryolock: togliere il tappo.
8. I seguenti passaggi (da 9 a 13) devono essere eseguiti nel giro di 80-110 secondi. **ATTENZIONE** – L'esposizione dei campioni alla VS deve essere limitata per evitare effetti citotossici. I campioni tendono a galleggiare nella VS; regolare quindi la messa a fuoco del microscopio in modo da mantenere la visualizzazione continua durante l'esposizione e tenere vicina la punta della pipetta di trasferimento per assicurare il trasferimento rapido da una goccia all'altra della VS. Vedere la Figura 6.
 9. Una volta completata l'equilibratura nella ES, aspirare una certa quantità di quest'ultima nella pipetta di trasferimento e trasferire i campioni di volume minimo dalla goccia di ES nella goccia di VS per 30 secondi.

10. Caricare e sigillare a caldo il CryoTip come segue (vedere la Figura 7a):

- Fare scorrere in su la guaina metallica di copertura lungo il CryoTip per esporre l'estremità in vetro tirato della punta sottile.
- Usando la siringa Hamilton sul CryoTip mentre si osservano i componenti al microscopio, aspirare con attenzione un piccolo volume di VS sino al segno n. 1 sul CryoTip.
- Continuando l'osservazione al microscopio, aspirare delicatamente il campione con VS sino al segno n. 2 sul CryoTip.
- Osservare il CryoTip direttamente e aspirare un'ulteriore quantità di VS sino al segno n. 3.
- Il campione deve trovarsi fra i segni n. 2 e n.3.
- Sigillare a caldo (sigillatura n. 1) il CryoTip sul segno n. 1 (o appena al disotto) e fare scorrere in giù la guida di copertura per coprire e proteggere l'estremità in vetro tirato della punta sottile.
- Estrarre con attenzione il CryoTip dall'adattatore e dal dispositivo di aspirazione, quindi sigillare a caldo (sigillatura n. 2) all'estremità spessa del CryoTip sopra il segno n. 4.
- Immergere il CryoTip coperto direttamente in azoto liquido (velocità di raffreddamento pari $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) (vedere la Figura 7b).

Caricare e sigillare la paillette HSV come segue:

- Con una micropipetta, depositare con attenzione i campioni nel canale del tubo capillare a 1 mm di distanza dall'estremità. La goccia contenente i campioni deve avere volume inferiore a 0,5 μl . Non più di due 2 ovociti o embrioni per ciascun tubo capillare.
- Posizionare immediatamente il tubo capillare e il dispositivo di inserimento nella paillette, e spingere finché la parte rettangolare del dispositivo stesso non va a contatto dell'estremità svasata della paillette.
- Pizzicare delicatamente la paillette tra il pollice e un altro dito ed estrarre il dispositivo di inserimento.
- Tenendo la paillette in posizione, sigillare l'estremità aperta con una sigillatrice SYMS.
- Tenere la paillette con delle pinzette all'altezza dell'asta di manipolazione.
- Immergere rapidamente l'intera paillette nell'azoto liquido (LN_2) mantenendola in posizione verticale e agitarla delicatamente per alcuni secondi in modo da evitare la formazione di uno strato di bolle d'aria isolante attorno alla stessa.

Caricare il Cryolock come segue:

- Con una micropipetta, caricare delicatamente un massimo di 2 campioni sulla superficie concava della punta (stesso lato del logo Cryolock) a circa 3 mm (1/8") dal margine della punta stessa (usare il segno nero come riferimento), eliminando l'eventuale soluzione crioprotettiva in eccesso e lasciando il volume minore possibile ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$) del terreno di vitrificazione.
- Opzione A: prima di immergere il Cryolock in LN_2 , inserire immediatamente e con attenzione la punta nel tappo, girandolo strettamente finché non è ben saldo.
- Opzione B: immergere immediatamente la punta e il tappo in LN_2 . Attendere che la formazione di bolle cessi, per consentire l'equilibratura. Inserire con attenzione la punta nel tappo, girandolo strettamente finché non è ben saldo.
NOTA – L'opzione B non è stata approvata per l'uso negli USA.
- Immergere rapidamente il Cryolock in azoto liquido.
NOTA – Conservare sempre il Cryolock con il tappo rivolto verso il basso.

11. Porre il CryoTip, la paillette HSV o il Cryolock vitrificati nella crioprovetta o nel goblet (sul CryoCane) sommerso pieno di LN_2 . Tappare la crioprovetta (o il goblet) o collegarla, capovolta, a un'altra crioprovetta priva di tappo per fissare il dispositivo vitrificato in azoto liquido.
12. Spostare il serbatoio di LN_2 vicino al criocongelatore a LN_2 e trasferirvi il supporto CryoCane e il relativo contenuto per la conservazione a lungo termine.

B. EMBRIONI (da PN a blastocisti)

Protocollo di vitrificazione

1. Dispensare in modo asettico una goccia da 50 μl di ES sul coperchio capovolto di una piastra di Petri.
2. Estrarre dall'incubatore la piastra di coltura contenente l'embrione o gli embrioni e verificare la qualità dei campioni al microscopio. Ove possibile, selezionare solo gli embrioni della migliore qualità ai fini della vitrificazione.
3. Trasferire con attenzione il campione (fino a due alla volta), con un volume minimo di terreno, dalla piastra di coltura alla goccia di ES e avviare il timer.
L'equilibratura degli embrioni deve avvenire lentamente nella goccia di ES, in caduta libera, per 6-10 minuti.
Nota – Il campione si contrae e torna quindi gradualmente alle dimensioni originali; a questo punto, l'equilibratura è completa.
ATTENZIONE – Ridurre al minimo l'esposizione dei campioni alla luce durante l'equilibratura nelle gocce di ES e VS.
4. Durante questo periodo di equilibratura in ES:
 - preparare una goccia da 50 μl di soluzione VS come mostrato nella Fig. 8 e preparare il CryoTip, la paillette o il Cryolock per il caricamento.

Seguire il protocollo sopra descritto (Sezione A - Protocollo di vitrificazione di ovociti [MII]) dal punto 9 al punto 12 per l'esposizione alle soluzioni VS, il caricamento del CryoTip, della paillette HSV o del Cryolock, l'immersione in LN_2 e la conservazione a lungo termine.

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 °C e 8 °C. Se conservate secondo le istruzioni, le soluzioni del Vitrifaction Freeze 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.

Come precauzione supplementare durante la procedura di preparazione, si consiglia di esaminare con attenzione ciascun CryoTip nel momento in cui lo si estrae dalla confezione. Prima dell'uso, i CryoTip devono essere esaminati al microscopio (ingrandimento di 40x) per escludere la presenza di eventuali danni (quali rotture o incrinature della punta) dovuti al trasporto.

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 stabiliti. 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 paziente 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.

INDICACIONES DE USO

El Vit Kit-Freeze se ha diseñado para su uso en procedimientos de reproducción asistida, y más concretamente para la vitrificación y conservación de ovocitos humanos (MI), cigotos pronucleares (PN), embriones en el estadio de división del día 3 y embriones en el estadio de blastocisto. Este kit se ha diseñado para su uso con el CryoTip (n.º de catálogo 40709) y el Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) con vistas a una recuperación óptima de las muestras.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

La **Equilibration Solution-ES** es una solución tamponada de HEPES del Medium-199 que contiene sulfato de gentamicina, 7,5 % (v/v) de DMSO y etilenglicol, respectivamente, y 20 % (v/v) del Dextran Serum Supplement (DSS).

La **Vitrification Solution-VS** es una solución tamponada de HEPES del Medium-199 que contiene sulfato de gentamicina, 15 % (v/v) de DMSO y etilenglicol, respectivamente, 20 % (v/v) del DSS y sacarosa 0,5 M.

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-Freeze, es decir, con una concentración final de HSA de 10 mg/ml y de dextrano de 4 mg/ml.

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

COMPOSICIÓN

Sales e iones

Cloruro sódico
Fosfato sódico
Cloruro potásico
Sulfato de magnesio
Acetato sódico
Cloruro cálcico
Cloruro de colina
Nitrato férrico

Sistemas tampón

Bicarbonato sódico
HEPES

Indicador del pH

Rojo de fenol

Aminoácidos

Arginina
Glicina
Histidina
Lisina

Prolina
Tirosina
Alanina
Ácido aspártico
Ácido glutámico
Isoleucina
Leucina
Metionina
Fenilalanina
Serina

Treonina
Triptófano
Valina
Hidroxiprolina
Cistina
Cisteína

Antioxidante

Glutatión

Otro

Sulfato de adenina
Desoxirribosa
Ribosa
Guanina
Uracilo
Xantina
Timina
Hipoxantina
Adenosina

Vitaminas y minerales

Calciferol
Ácido ascórbico
Ácido aminobenzoico
Ácido nicotínico
Amida del ácido nicotínico
Ácido pantoténico
Riboflavina
Tiamina
Biotina

Piridoxina
Bisulfito de sodio
Ácido fólico
Alfa-tocoferol

Antibiótico

Sulfato de gentamicina

Fuentes de energía

Glucosa
Inositol

Proteína

Albúmina sérica humana

Crioprotector

Dextrano
Sacarosa
Etilenglicol
Dimetilsulfóxido

Agua

Calidad de agua para inyectables

CONTROL DE CALIDAD

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

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

Soluciones y CryoTips.

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.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (n.º de catálogo 40709) o pajuela de HSV (n.º de catálogo 25246-25251) o Cryolock™ (n.º de catálogo CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Connector (n.º de catálogo 40736) u otro adaptador
- Placas de Petri estériles (50 X 9 mm, Falcon 351006 o equivalente)
- Viales de congelación (4,5 ml) o copas y criocañías
- HTF modificado - HEPES con proteína (n.º de catálogo 90126): medio de cultivo suplementado con proteína
- Hialuronidasa (n.º de catálogo 90101)
- Guantes desechables
- Jeringa de Hamilton GASTIGHT® (50 µl, n.º de catálogo 80901) u otro utensilio de aspiración
- Pipetas de transferencia (pipetas de vidrio estiradas o puntas de micropipeta que tengan un diámetro interno de ~200 µm)
- Pinzas
- Sellador de calor por impulsos
- Sellador SYMS para pajuelas de HSV

- 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])

INSTRUCCIONES DE USO

Requisitos de los componentes Vit Kit-Freeze (por aplicación):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl para el protocolo de vitrificación de ovocitos
0
50 µl para el protocolo de vitrificación de embriones
- Vitrification Solution (VS):
50 µl para el protocolo de vitrificación
- 1 CryoTip o pajuela de HSV o Cryolock (almacena hasta 2 muestras)
- 1 conector

PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN:

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 el equilibrio en las soluciones ES y VS.

1. Lleve a temperatura ambiente (20-27 °C) la cantidad de ES y VS que desee utilizar. **NOTA:** Procure no llevar de forma reiterada a temperatura ambiente los viales enteros de ES y VS cada vez que necesite una parte 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. El HTF modificado - HEPES con proteína también se necesita para el protocolo de vitrificación de ovocitos.
2. Llene de nitrógeno líquido el depósito correspondiente hasta una profundidad de 4 in (10 cm) o hasta la profundidad necesaria para sumergir todo el vial de congelación de la caña y colóquelo cerca del microscopio. Introduzca un vial de congelación o copa (sin tapar) en el soporte inferior de una criocaña y sumérjalos en el nitrógeno líquido como paso previo a la conservación de las muestras vitrificadas.
3. Cuente el número de muestras que desee vitrificar.
4. Etiquete cada placa de Petri estéril (o tapa) y cada dispositivo de crioconservación con la información necesaria.
5. Invierta con suavidad dos veces cada vial de ES y VS para mezclar su contenido antes de usarlo.
6. Prepare la placa con gotas de las soluciones para el procedimiento de vitrificación de la siguiente manera:

A. Protocolo de vitrificación de OVOCITOS (MII):

NOTA 1: Los ovocitos recuperados se decuman con hialuronidasa para confirmar que se encuentran en la metafase II (MII).

NOTA 2: Consulte el protocolo de vitrificación de embriones en la sección B.

1. Dispense de manera aseptica sendas gotas de 20 µl del medio de cultivo, HTF modificado - HEPES con proteína y ES (con proximidad entre ellas) 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 20 µl de HTF modificado - HEPES con proteína
 - tres gotas de 20 µl (60 µl en total) de ES (ES1, ES2, ES3)
2. Retire de la incubadora la placa de cultivo que contiene los ovocitos MII y verifique la calidad de las muestras bajo el microscopio. Seleccione, si es posible, solo el ovocito u ovocitos óptimos de la etapa MII.
PRECAUCIÓN: Minimice la exposición a la luz de la(s) muestra(s) durante el equilibrio en las gotas de H, ES y VS.
3. Transfiera el ovocito (hasta 2 a la vez) con un volumen mínimo de medio de la placa de cultivo (en la incubadora) a la gota de 20 µl de **H** durante un minuto.
4. Con la punta de la pipeta de transferencia fusione la gota de H con la de ES1 (véase la figura 1, flecha 1) y deje que se mezclen espontáneamente las dos soluciones durante 2 minutos.
5. Luego, fusione la gota de ES2 (flecha 2) con las gotas previamente fusionadas y deje que se mezclen durante 2 minutos.
6. Transfiera el ovocito u ovocitos que tengan un volumen mínimo de solución de la gota fusionada a la gota ES3 durante 6-10 minutos. **NOTA:** el equilibrio de los ovocitos en ES3 se completa cuando el espesor de la zona pelúcida se iguala con el del espacio perivitelino. El ovocito u ovocitos se sedimentarán de ordinario en el fondo de la gota en 3 minutos.
7. Durante el período de equilibrio en ES3:
Dispense de manera aseptica una (1) gota de 50 µl de VS 2 minutos antes de completar el equilibrio y prepare el CryoTip (fig. 3), la pajuela de HSV (fig. 4) o el Cryolock (fig. 5) para la carga:

NOTA: Examine con cuidado el dispositivo de vitrificación y la punta antes de comenzar el procedimiento.

- CryoTip: se conecta a la jeringa de Hamilton o al utensilio de aspiración pertinente con un conector o adaptador para asegurar un cierre hermético. **NOTA:** Deje la funda metálica protectora sobre la punta fina estirada para protegerla hasta que esté lista para cargar las muestras.
 - Pajuela de HSV: conecte el extremo más largo del dispositivo de inserción azul de plástico al extremo de color de la varita de manipulación.
 - Cryolock: quite la tapa.
8. Los pasos siguientes (9-13) se completarán en 80-110 segundos. **PRECAUCIÓN:** La exposición de las muestras a VS se limitará para evitar la citotoxicidad. La(s) muestra(s) tienden a flotar en la VS, así que enfoque el microscopio para visualizar la exposición en todo momento y acerque la punta de la pipeta de transferencia para facilitar una transferencia rápida entre las gotas de VS. Consulte la figura 6.

9. Después de que se complete el equilibrio en la ES, aspire parte de la ES a la pipeta de transferencia y transfiera la(s) muestra(s) con un volumen mínimo de la gota de ES a la gota de VS durante 30 segundos.
 10. Cargue y selle con calor el CryoTip de la siguiente manera (véase la figura 7a):
 - Deslice la funda metálica protectora a lo largo del CryoTip para exponer el extremo fino y frágil de la punta.
 - Manipule el CryoTip y la jeringa de Hamilton bajo el microscopio y aspire con cuidado un pequeño volumen de la VS hasta la marca 1 del CryoTip.
 - Continúe observando bajo el microscopio y aspire con suavidad la muestra con la VS hasta la marca 2 del CryoTip.
 - Observe ahora directamente el CryoTip y aspire más VS hasta la marca 3.
 - La muestra deberá ubicarse entre las marcas 2 y 3.
 - Selle con calor (sello n.º 1) el CryoTip por la marca 1 (o justo debajo de ella) y vuelva a deslizar la funda de la cubierta hacia abajo para cubrir y proteger la punta fina y frágil.
 - Extraiga con cuidado el CryoTip del utensilio de aspiración y el adaptador y luego selle con calor (sello n.º 2) el extremo grueso del CryoTip por encima de la marca 4.
 - Sumerja directamente el CryoTip cubierto en nitrógeno líquido (enfriando a una velocidad de -12.000 °C/min) (véase la figura 7b).
- Cargue y selle la pajuela de HSV de la siguiente manera:
- Con una micropipeta, deposite con cuidado la(s) muestra(s) en el surco de la varita capilar a 1 mm del extremo. La gota con la(s) muestra(s) debe contener menos de 0,5 µl. 2 ovocitos o embriones como máximo por cada varita capilar.
 - Coloque de inmediato la varita capilar y el manipulador en la pajuela y empuje hasta que la porción rectangular del manipulador entre en contacto con el extremo ensanchado de la pajuela.
 - Pellizque ligeramente la pajuela entre el pulgar y los demás dedos y retire el dispositivo de inserción.
 - Sosteniendo la pajuela, selle el extremo abierto con un sellador SYMS.
 - Sostenga la pajuela con pinzas por la varita de manipulación.
 - Sumerja verticalmente enseguida toda la pajuela en N₂L. Remueva con suavidad la pajuela en N₂L durante unos segundos para que no se forme una capa aislante de burbujas de aire a su alrededor.
- Cargue el Cryolock de la manera siguiente:
- Con una micropipeta, cargue con cuidado 2 muestras (como máximo) en la superficie cóncava de la punta (mismo lado del logotipo de Cryolock) a unos 3 mm (1/8 in) del borde de la punta (utilice la marca negra como referencia), elimine cualquier exceso de la solución crioprotectora y deje el mínimo volumen posible del medio de vitrificación (≤1 µl).
 - Opción A: De inmediato y antes de sumergir el Cryolock dentro del N₂L, inserte con cuidado la punta en la tapa girando con firmeza hasta que asiente de manera segura.
 - Opción B: Sumerja de inmediato la punta y la tapa en el N₂L. Espere a que se detenga el burbujeo para que se alcance el equilibrio. Inserte con cuidado la punta en la tapa, girando con la firmeza suficiente hasta que se asiente de manera segura.
- NOTA: La opción B no está autorizada en Estados Unidos.
- Sumerja enseguida el Cryolock en el nitrógeno líquido.
- NOTA: Almacene siempre el Cryolock con la tapa hacia abajo.
11. Coloque el CryoTip, la pajuela HSV o el Cryolock vitrificados en el vial de congelación o copa (en la criocafía) llenos y sumergidos en el depósito de N₂L. Tape el vial de congelación (o copa) o invértalo y conéctelo a otro vial de congelación destapado para que el dispositivo vitrificado permanezca dentro del nitrógeno líquido.
 12. Acerque el depósito de N₂L al criocongelador de N₂L y transfiera la criocafía con su contenido al criocongelador para su conservación a largo plazo.

B. EMBRIONES (de PN a blastocisto):

Protocolo de vitrificación:

1. Dispense de manera aséptica una gota de 50 µl de ES en una tapa invertida de una placa de Petri.
2. Retire de la incubadora la placa de cultivo con el embrión u embriones y verifique la calidad de la(s) muestra(s) bajo el microscopio. Seleccione, si es posible, solo el embrión u embriones óptimos para la vitrificación.
3. Transfiera con cuidado la muestra (hasta dos a la vez) con un volumen mínimo de medio desde la placa de cultivo hasta la gota de ES y ponga en marcha el temporizador.
Los embriones deben equilibrarse lentamente por caída libre en la gota de ES durante 6-10 minutos.
Nota: La muestra se encogerá y luego recuperará poco a poco su tamaño original; esto indica que se ha alcanzado el equilibrio.
PRECAUCIÓN: Minimice la exposición a la luz de la(s) muestra(s) durante el equilibrio en las gotas de ES y VS.
4. Durante el período de equilibrio en ES:
 - Prepare una gota de 50 µl de la solución VS como se muestra en la figura 8 y prepare el CryoTip, la pajuela de HSV o el Cryolock para la carga.

Siga los pasos 9 a 12 del protocolo redactado con anterioridad (sección A: Protocolo de vitrificación de ovocitos [MI]) para la exposición a las soluciones VS, carga del CryoTip, pajuela de HSV o Cryolock, inmersión en N₂L y almacenamiento a largo plazo.

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

Conserve 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 Freeze 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.

Como precaución adicional durante el procedimiento de preparación, recomendamos que se examine con cuidado cada CryoTip después de sacarlo del envase. Antes de su uso, los CryoTips se deben examinar con un nivel de aumento adecuado (40 aumentos) para detectar posibles daños (como roturas o grietas en las puntas) que puedan haberse producido durante el transporte.

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 asepticas.

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.

INDICATIONS

Le Vit Kit-Freeze est destiné à être utilisé lors des procédures de procréation médicalement assistée pour la vitrification et la conservation d'ovocytes humains (MI), de zygotes pronucléaires (PN), d'embryons du premier au troisième jour du stade de segmentation et d'embryons au stade blastocyste. Ce kit est conçu pour être utilisé avec des CryoTips (réf. 40709) et le Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) pour un rétablissement optimal des échantillons.

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

L'**Equilibration Solution-ES** est une solution de milieu 199 tamponnée à l'HEPES contenant du sulfate de gentamicine, 7,5 % (v/v) de DMSO et d'éthylène glycol et 20 % (v/v) de DSS (Dextran Serum Supplement).

La **Vitrification Solution-VS** est une solution de milieu 199 tamponnée à l'HEPES contenant du sulfate de gentamicine, 15 % (v/v) de DMSO et d'éthylène glycol, 20 % (v/v) de DSS et 0,5 M de saccharose.

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-Freeze avec une concentration finale de 10 mg/ml de HSA et 4 mg/ml de dextrane.

Ces deux solutions doivent être utilisées successivement selon les étapes du protocole de vitrification en microgouttes.

COMPOSITION

Sels et ions

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

Tampon

Bicarbonate de sodium
HEPES

Indicateur de pH

Rouge de phénol

Acides aminés

Arginine
Glycine
Histidine
Lysine

Proline
Tyrosine
Alanine
Acide aspartique
Acide glutamique
Isoleucine
Leucine
Méthionine
Phénylalanine
Sérine

Thréonine
Tryptophane
Valine
Hydroxyproline
Cystine
Cystéine

Antioxydant

Glutathion

Autre

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

Vitamines et minéraux

Calciférol
Acide ascorbique
Acide aminobenzoïque
Acide nicotinique
Nicotinamide (amide de l'acide nicotinique)
Acide pantothénique
Riboflavine
Thiamine

Biotine
Pyridoxine
Bisulfite de sodium
Acide folique
Alpha tocophérol

Antibiotique

Sulfate de gentamicine

Substrats énergétiques

Glucose
Inositol

Protéine

Albumine sérique humaine

Cryoprotecteur

Dextrane
Saccharose
Éthylène Glycol
Diméthylsulfoxyde

Eau

Qualité WFI

ASSURANCE QUALITÉ

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

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

Solutions et CryoTips :

Teneur en endotoxines évaluée par la méthode LAL (lysat d'améboocytes de limule) ($\leq 0,6$ EU/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.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON INCLUS

- CryoTip (réf. 40709) ou paillette HSV Straw (réf. 25246-25251) ou Cryolock™ (réf. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O) Irvine Scientific, LLC
- Raccord Irvine Scientific, LLC (réf. 40736) ou autre adaptateur
- Boîtes de Pétri stériles (50 × 9 mm, Falcon 351006 ou modèle équivalent)
- Cryotubes (4,5 ml) ou gobelets et cryocannes
- Milieu de culture HTF modifié - HEPES supplémenté en protéines (réf. 90126)
- Hyaluronidase (réf. 90101)
- Gants jetables
- Seringue Hamilton GASTIGHT® (50 µl, réf. 80901) ou autre dispositif d'aspiration
- Pipettes de transfert (pipettes en verre tiré ou cônes de micropipette d'un diamètre intérieur d'environ 200 µm)
- Pincettes ou pinces
- Thermoscelleuse à impulsions
- Scelleuse SYMS pour HSV Straw

- 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 4 po [10 cm] dans le réservoir)

MODE D'EMPLOI

Composants du Vit Kit-Freeze requis (par application) :

- Equilibration Solution (ES) :
60 µl pour le protocole de vitrification des ovocytes
ou
50 µl pour le protocole de vitrification des embryons
- Vitrification Solution (VS) :
50 µl pour le protocole de vitrification
- 1 CryoTip ou paillete HSV Straw ou Cryolock (stockage de jusqu'à deux spécimens)
- 1 raccord

PROTOCOLE DE VITRIFICATION :

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 l'équilibrage dans les solutions ES et VS.

1. Préparer les volumes de solutions ES et VS à utiliser et les laisser s'équilibrer à température ambiante (entre 20 et 27 °C).
REMARQUE : éviter de mettre les tubes entiers de solutions ES et VS à température ambiante à plusieurs reprises si seulement une portion de la solution est nécessaire pour chaque vitrification. Il est préférable de prélever la quantité à utiliser et de conserver les tubes entre 2 et 8 °C après l'aliquotage. Le milieu HTF modifié (HEPES) avec protéines est aussi requis pour le protocole de vitrification des ovocytes.
2. Remplir le réservoir d'azote liquide d'une quantité suffisante pour obtenir une profondeur de 4 po (10 cm) ou pour immerger complètement le cryotube fixé sur une cryocanne, et le placer à proximité du microscope. Installer un cryotube ou un gobelet (non fermé) dans le logement inférieur d'une cryocanne et l'immerger dans l'azote liquide en vue de la conservation des spécimens vitrifiés.
3. Déterminer le nombre de spécimens à vitrifier.
4. Étiqueter chaque boîte de Pétri (ou couvercle) stérile, ainsi que le dispositif de conservation cryogénique en indiquant les informations nécessaires.
5. Retourner délicatement deux fois chaque tube de solutions ES et VS pour en mélanger le contenu avant l'utilisation.
6. Préparer une boîte de Pétri avec des gouttelettes des solutions nécessaires pour la procédure de vitrification, comme suit :

A. Protocole de vitrification des OVOCYTES (MI) :

REMARQUE 1 : les ovocytes collectés doivent être décoronisés dans une solution de hyaluronidase afin de confirmer qu'ils sont bien en métaphase II (MI).

REMARQUE 2 : se reporter à la section B pour le protocole de vitrification des embryons.

1. De manière aseptique, déposer à proximité les unes des autres une goutte de 20 µl de milieu de culture HTF modifié-HEPES avec protéines et trois gouttes de 20 µl de solution ES 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 20 µl de milieu HTF modifié (HEPES avec protéines)
 - trois gouttes de 20 µl (60 µl au total) de ES (ES1, ES2, ES3)
2. Sortir la boîte de culture contenant les ovocytes MI de l'incubateur et vérifier leur qualité au microscope. Si possible, choisir seulement l'ovocyte/les ovocytes MI de qualité optimale.
MISE EN GARDE : minimiser l'exposition des spécimens à la lumière pendant l'équilibrage dans les gouttes H, ES et VS.
3. Transférer les ovocytes (un à deux à la fois) avec un volume minimal de milieu de la boîte de culture (provenant de l'incubateur) dans la goutte de 20 µl de milieu H pendant une minute.
4. Faire fusionner la goutte de H à la goutte ES1 (voir la figure 1, flèche 1) avec la pointe de la pipette de transfert, et laisser les deux solutions se mélanger spontanément pendant 2 minutes.
5. Faire ensuite fusionner la goutte de ES2 (flèche 2) aux gouttes précédemment fusionnées et laisser reposer pendant 2 minutes.
6. Transférer le ou les ovocytes avec un volume minimal de solution de la goutte fusionnée dans la goutte de ES3 pendant 6 à 10 minutes. **Remarque** : l'équilibrage des ovocytes dans ES3 est terminé lorsque l'épaisseur de la zone pellucide est égale à celle de l'espace périvitellin. En général, les ovocytes se déposent au fond de la goutte dans les 3 minutes.
7. Pendant l'équilibrage dans ES3 :
Déposer aseptiquement une (1) goutte de 50 µL de solution de vitrification (VS) 2 minutes avant la fin de l'équilibrage, et préparer le CryoTip (fig. 3), la paillete HSV Straw (fig. 4) ou le Cryolock (fig. 5) pour le chargement :
REMARQUE : inspecter minutieusement le dispositif de vitrification ainsi que sa pointe avant de commencer la procédure.
 - CryoTip : le raccorder à une seringue Hamilton ou à un dispositif d'aspiration au moyen d'un raccord ou d'un adaptateur, afin de garantir une étanchéité parfaite. **REMARQUE** : garder le manchon métallique sur la pointe fine étirée afin de la protéger jusqu'à ce que tout soit prêt pour charger les spécimens.
 - Paillete HSV Straw : raccorder la plus longue extrémité du dispositif d'insertion en plastique bleu à l'extrémité colorée du jonc de préhension.
 - Cryolock : retirer le capuchon.

8. Les étapes suivantes (9 à 13) doivent être terminées en 80 à 110 secondes. MISE EN GARDE : l'exposition des spécimens à la solution de vitrification (VS) doit être limitée pour éviter toute cytotoxicité. Comme les spécimens ont tendance à flotter dans la solution de vitrification (VS), ajuster la mise au point du microscope pour maintenir une visualisation continue durant l'exposition et garder la pointe de la pipette de transfert à proximité pour assurer un transfert rapide entre les différentes gouttes de VS. Se reporter à la figure 6.
9. Une fois l'équilibrage dans la solution ES terminé, aspirer un peu de solution ES dans la pipette de transfert et transférer les spécimens avec un minimum de volume de la goutte de ES dans la goutte de VS pendant 30 secondes.
10. Charger et thermosceller le CryoTip comme indiqué ci-après (voir la figure 7a) :
 - Faire coulisser le manchon métallique le long du CryoTip pour le relever et exposer la pointe fine et fragile du CryoTip.
 - En manipulant le CryoTip et la seringue Hamilton sous le microscope, aspirer délicatement un petit volume de solution VS jusqu'au repère n°1 du CryoTip.
 - Toujours sous contrôle microscopique, aspirer délicatement le spécimen avec la solution VS jusqu'au repère n°2 du CryoTip.
 - Ensuite, en regardant directement le CryoTip, aspirer plus de solution VS jusqu'au repère n°3.
 - Le spécimen doit se trouver entre le repère n°2 et le repère n°3.
 - Thermoceller le CryoTip au niveau ou juste en dessous du repère n°1 (soudure n°1), et faire coulisser le manchon vers le bas pour couvrir et protéger la pointe fine et fragile.
 - Retirer précautionneusement le CryoTip du dispositif d'aspiration et de l'adaptateur, puis thermosceller au niveau de l'extrémité épaisse du CryoTip au-dessus du repère n°4 (soudure n°2).
 - Plonger le CryoTip couvert directement dans l'azote liquide (vitesse de refroidissement de -12 000 °C/min) (voir la figure 7b).
- Charger et sceller la paillette HSV Straw comme suit :
 - À l'aide d'une micropipette, déposer avec précautions le ou les spécimens dans la gouttière du capillaire à 1 mm de l'extrémité. La goutte contenant le ou les spécimens doit être inférieure à 0,5 µl. Mettre deux ovocytes ou embryons au maximum dans chaque capillaire.
 - Insérer immédiatement le capillaire avec le dispositif d'insertion dans la paillette, et les pousser jusqu'à ce que la partie rectangulaire du dispositif d'insertion entre en contact avec l'extrémité évasée de la paillette.
 - Pincer légèrement la paillette entre le pouce et l'index et retirer le dispositif d'insertion.
 - Tout en maintenant la paillette en place, sceller l'ouverture à l'aide de la scelleuse SYMS.
 - Tenir la paillette avec des pinces au niveau du jonc de préhension.
 - Plonger rapidement la totalité de la paillette en position verticale dans le LN₂. Remuer délicatement la paillette dans le LN₂ pendant quelques secondes afin d'éviter la formation d'une couche de bulles d'air isolantes autour de la paillette.
- Charger le Cryolock comme suit :

À l'aide d'une micropipette, déposer délicatement un ou deux spécimens sur la surface concave de la pointe (du même côté que le logo Cryolock), à environ 3 mm (1/8 po) du bord de la pointe (utiliser la marque noire comme point de référence), en prenant soin de retirer tout excédent de solution cryoprotectrice et de ne laisser que le plus petit volume possible de milieu de vitrification (≤ 1 µl).

 - Option A : avant de plonger le Cryolock dans le LN₂, insérer délicatement la pointe du Cryolock dans le capuchon puis le visser à fond pour bien le fermer.
 - Option B : Plonger immédiatement la pointe et le capuchon dans le LN₂. Attendre que les bulles s'arrêtent pour permettre l'équilibrage. Insérer délicatement la pointe dans le capuchon et le visser suffisamment pour bien le fermer.

REMARQUE : l'utilisation de l'option B n'est pas autorisée aux États-Unis.

 - Plonger rapidement le Cryolock dans l'azote liquide.

REMARQUE : toujours stocker le Cryolock avec le capuchon vers le bas.
11. Placer le CryoTip, la paillette VHS Straw ou le Cryolock vitrifié dans le cryotube ou le gobelet immergé et rempli de LN₂ (sur la cryocanne). Fermer le cryotube (ou le gobelet) ou le retourner et le fixer à un autre cryotube non fermé pour maintenir le dispositif de vitrification en place dans l'azote liquide.
12. Rapprocher le réservoir de LN₂ du congélateur cryogénique et transférer la cryocanne avec son contenu dans le congélateur cryogénique pour une conservation à long terme.

B. EMBRYONS (PN à blastocyste)

Protocole de vitrification :

1. Déposer aseptiquement une goutte de 50 µl de solution ES sur le couvercle retourné d'une boîte de Pétri.
2. Sortir la boîte de culture contenant l'embryon/les embryons de l'incubateur et vérifier leur qualité au microscope. Si possible, choisir seulement l'embryon/les embryons de qualité optimale pour la vitrification.
3. Transférer délicatement les spécimens (un à deux à la fois) avec un volume minimal de milieu de la boîte de culture dans la goutte de solution ES et démarrer la minuterie.
Les embryons doivent s'équilibrer lentement dans la goutte de solution ES en s'y enfonçant par gravité pendant 6 à 10 minutes.
Remarque : les spécimens rétréciront, puis reprendront leur taille initiale, ce qui indique que l'équilibrage est terminé.
MISE EN GARDE : minimiser l'exposition des spécimens à la lumière pendant l'équilibrage dans les gouttes ES et VS.
4. Pendant l'équilibrage dans la solution ES :
 - déposer une goutte de 50 µl de solution VS comme illustré à la figure 8, puis préparer le CryoTip, la paillette HSV Straw ou le Cryolock pour le chargement.

Suivre le protocole décrit ci-dessus (section A - Protocole de vitrification des ovocytes [MI]) des étapes 9 à 12 pour l'exposition aux solutions de vitrification VS, la procédure de chargement du CryoTip, de la paillette HSV Straw ou du Cryolock, l'immersion dans le LN₂ et la conservation à long terme.

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 Freeze 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.

Par mesure de précaution supplémentaire pendant les préparatifs, il est recommandé d'inspecter minutieusement chaque CryoTip à la sortie de son emballage. Avant utilisation, les CryoTips doivent être examinés au microscope à un grossissement approprié (x40) pour détecter toute éventuelle détérioration (telle que bris ou fissures de la pointe) qui aurait pu survenir durant le transport.

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 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.

INDICAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

O Vit Kit-Freeze foi concebido para utilização em técnicas de reprodução assistida para vitrificação e conservação de oócitos (MI), zigotos pronucleares (PN) até ao 3.º dia do estágio de clivagem embrionária e embriões no estágio de blastocistos humanos. Este kit foi concebido para utilização com a CryoTip (ref.ª 40709) e o Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) para uma excelente recuperação de amostras.

DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

A **Equilibration Solution-ES** é uma solução com tampão HEPES de Medium-199 com sulfato de gentamicina, DMSO e etilenoglicol a 7,5% (v/v) cada e suplemento de soro dextrano (DSS) a 20% (v/v).

A **Vitrification Solution-VS** é uma solução com tampão HEPES de Medium-199 com sulfato de gentamicina, DMSO e etilenoglicol a 15% (v/v) cada, DSS a 20% (v/v) e sacarose 0,5 M.

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-Freeze para uma concentração final de 10 mg/ml de HSA e de 4 mg/ml de dextrano.

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

COMPOSIÇÃO

Sais e iões

Cloreto de sódio
Fosfato de sódio
Cloreto de potássio
Sulfato de magnésio
Acetato de sódio
Cloreto de cálcio
Cloreto de colina
Nitrato de ferro

Tampão

Bicarbonato de sódio
HEPES

Indicador de pH

Vermelho de fenol

Aminoácidos

Arginina
Glicina
Histidina
Lisina

Prolina
Tirosina
Alanina
Ácido aspártico
Ácido glutâmico
Isoleucina
Leucina
Metionina
Fenilalanina
Serina
Treonina
Triptofano
Valina
Hidroxiprolina
Cistina
Cisteína

Antioxidante

Glutationa

Outro

Sulfato de adenina
Desoxirribose
Ribose
Guanina
Uracilo
Xantina
Timina
Hipoxantina
Adenosina
Vitaminas e minerais
Calciferol
Ácido ascórbico
Ácido aminobenzoico
Ácido nicotínico
Amido de ácido nicotínico
Ácido pantoténico
Riboflavina
Tiamina
Biotina

Piridoxina
Bissulfito de sódio
Ácido fólico
Alfa-tocoferol

Antibióticos

Sulfato de gentamicina

Substratos energéticos

Glucose
Inositol

Proteína

Albumina sérica humana

Crioprotetor

Dextrano
Sacarose
Etilenoglicol
Dimetilsulfóxido

Água

Qualidade WFI (água
p/ preparações injetáveis)

GARANTIA DE QUALIDADE

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

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

Soluções e CryoTips.

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.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- CryoTip da Irvine Scientific, LLC (ref.ª 40709) ou HSV Straw (ref.ª 25246-25251) ou Cryolock™ (ref.ª CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Conector da Irvine Scientific, LLC (ref.ª 40736) ou outro adaptador
- Placas de Petri estéreis (50 mm X 9 mm, Falcon 351006 ou equivalente)
- Criotubos (4,5 ml) ou taças e varetas de criopreservação
- Meio de cultura Modified HTF – HEPES (ref.ª 90126) suplementado com proteína
- Hialuronidase (ref.ª 90101)
- Luvas descartáveis
- Seringa Hamilton GASTIGHT® (50 µl, ref.ª 80901) ou outra ferramenta de aspiração
- Pipetas de transferência (pipetas de vidro estirado ou pontas de micropipetas com um diâmetro interno na ponta de ~200 µm)
- Pinça de precisão ou prensão
- Dispositivo de termoselagem por impulsos
- Dispositivo de selagem SYMS para HSV Straw

- Cronómetro ou temporizador
- Reservatório de azoto líquido (Dewar ou recipiente de isopor com tampa, 1–2 l de volume)
- Azoto líquido (volume suficiente para ficar com cerca de 4 polegadas [10 cm] de profundidade no reservatório)

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Requisitos de componentes do Vit Kit-Freeze (por aplicação):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl para o protocolo de vitrificação de oócitos
Ou
50 µl para o protocolo de vitrificação de embriões
- Vitrification Solution (VS):
50 µl para o protocolo de vitrificação
- 1 CryoTip, HSV Straw ou Cryolock (armazenam até 2 espécimes)
- 1 conector

PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO:

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 o equilíbrio nas soluções ES e VS.

1. Deixar o volume das soluções ES e VS a utilizar atingir a temperatura ambiente (20 °C–27 °C). **NOTA:** Evitar levar tubos inteiros de ES e VS à temperatura ambiente repetidamente quando for necessária apenas uma parte da solução de cada vez. É melhor dividir em alíquotas na quantidade a utilizar e voltar a colocar os tubos a 2 °C–8 °C imediatamente após a divisão em alíquotas. Para o protocolo de vitrificação de oócitos, também é necessário o Modified HTF (HEPES) com proteína.
2. Deitar azoto líquido no respetivo reservatório (suficiente para uma profundidade de cerca de 4 polegadas [10 cm] ou para mergulhar totalmente o criotubo na vareta) e colocar junto do microscópio. Fixar um criotubo ou uma tampa (destapada) à bridadeira inferior de uma vareta de criopreservação e mergulhar no azoto líquido para preparar a conservação dos espécimes vitrificados.
3. Determinar o número de espécimes a vitrificar.
4. Identifique cada placa de Petri (ou tampa) estéril e o dispositivo de criopreservação com as informações necessárias.
5. Inverter cuidadosamente cada tubo de ES e VS duas vezes para misturar o conteúdo antes de utilizar.
6. Preparar a placa com gotas das soluções para o processo de vitrificação, como indicado a seguir:

A. Protocolo de vitrificação de OÓCITOS (MII):

NOTA 1: Os oócitos colhidos devem ser desnudados com hialuronidase para confirmar que estão maduros (MII).

NOTA 2: Consultar a Secção B sobre o protocolo de vitrificação de embriões.

1. Dispensar assepticamente uma gota de 20 µl de meio de cultura, de Modified HTF – HEPES com proteína, e de ES muito próximas na tampa invertida de uma placa de Petri estéril, como ilustrado na Figura 1, e colocar a placa na platina do microscópio:
 - uma gota de 20 µl de Modified HTF (HEPES com proteína)
 - três gotas de 20 µl (60 µl no total) de ES (ES1, ES2, ES3)
2. Retirar da incubadora a placa de cultura que contém os oócitos MII e verificar a qualidade dos espécimes ao microscópio. Quando possível, selecionar apenas oócitos na metafase MII de melhor qualidade.
3. CUIDADO: Reduzir ao mínimo a exposição do(s) espécime(s) à luz durante o equilíbrio nas gotas de soluções H, ES e VS. Transferir os oócitos (até 2 de cada vez) com o mínimo de volume de meio da placa de cultura (na incubadora) para a gota de 20 µl de H, durante um minuto.
4. Incorporar a gota de H na de ES1 (ver a Fig. 1, seta 1) com a ponta da pipeta de transferência e deixar ocorrer a mistura espontânea das duas soluções durante 2 minutos.
5. Em seguida, incorporar a gota de ES2 (seta 2) nas gotas anteriormente fundidas e deixar durante 2 minutos.
6. Transferir o(s) oócito(s) com o mínimo de volume de solução da gota fundida para a gota de ES3 durante 6–10 minutos. **Nota:** o equilíbrio do(s) oócito(s) na solução ES3 é atingido quando a espessura da zona pelúcida e do espaço perivitelino for igual. O(s) oócito(s) assenta(m) no fundo da gota dentro de 3 minutos.
7. Durante o tempo de equilíbrio na solução ES3:
 - Dispensar assepticamente uma (1) gota de 50 µl de solução VS 2 minutos antes de estar totalmente equilibrada e preparar a CryoTip (Fig. 3), HSV Straw (Fig. 4) ou Cryolock (Fig. 5) para carregamento:
 - NOTA:** Antes de iniciar o procedimento, examinar minuciosamente o dispositivo de vitrificação e a ponta.
 - CryoTip: ligar a seringa Hamilton ou uma ferramenta de aspiração adequada, utilizando um conector ou adaptador, para assegurar uma selagem apertada. **NOTA:** Manter a manga de cobertura metálica sobre a ponta fina estirada, para a proteger até estar pronta para o carregamento de espécimes.
 - HSV Straw: ligar a extremidade mais longa do dispositivo de inserção plástico azul à extremidade colorida da haste de manuseamento.
 - Cryolock: destacar a tampa.
8. Os seguintes passos (9–13) devem ser realizados em 80–110 segundos. CUIDADO: A exposição dos espécimes à solução VS deve ser limitada para evitar a citotoxicidade. O(s) espécime(s) tende(m) a flutuar na solução VS, pelo que se deve corrigir a focagem através do microscópio, para manter a visualização contínua durante a exposição, e manter a ponta da pipeta de transferência na proximidade para garantir uma rápida transferência entre gotas de solução VS. Ver a Figura 6.

9. Após o equilíbrio na solução ES estar concluído, extrair alguma solução ES para a pipeta de transferência e transfira o(s) espécime(s) com volume mínimo da gota da solução ES para a gota da solução VS durante 30 segundos.
 10. Carregar e aquecer o selo da CryoTip, da seguinte forma (ver Figura 7a):
 - Fazer deslizar a manga de cobertura metálica para cima ao longo da CryoTip, para expor a frágil extremidade da ponta fina.
 - Manusear a CryoTip e a seringa Hamilton enquanto observa ao microscópio e aspirar cuidadosamente um pequeno volume de VS até à marca n.º 1 da CryoTip.
 - Continuar a observação microscópica e aspirar cuidadosamente o espécime com a solução VS até à marca n.º 2 da CryoTip.
 - Agora, observar diretamente a CryoTip e aspirar mais solução VS até à marca n.º 3.
 - O espécime tem de estar situado entre a marca n.º 2 e a marca n.º 3.
 - Termosselar (selo n.º 1) a CryoTip na marca n.º 1 (ou logo abaixo) e fazer deslizar a manga de cobertura para trás, para cobrir e proteger a ponta fina frágil.
 - Remover cuidadosamente a CryoTip da ferramenta de aspiração e do adaptador e, em seguida, termosselar (selo n.º 2) na extremidade grossa da CryoTip acima da marca n.º 4.
 - Mergulhar a CryoTip coberta diretamente em azoto líquido (arrefecendo a uma taxa de $-12\ 000\ ^\circ\text{C}/\text{min}$) (ver Figura 7b).
- Carregar e selar a HSV straw tal como se segue:
- Depositar o(s) espécime(s) na goteira da haste capilar cuidadosamente, com uma micropipeta, a 1 mm da extremidade. A gota onde foram colocado(s) o(s) espécime(s) tem de ter menos de 0,5 μl . Cada haste capilar tem de ter no máximo 2 óócitos ou embriões.
 - Colocar imediatamente a haste capilar e o dispositivo de inserção no interior da palhinha e empurrar até a parte retangular do dispositivo de inserção entrar em contacto com a extremidade alargada da palhinha.
 - Apertar ligeiramente a palhinha entre um dedo e o polegar, e remover o dispositivo de inserção.
 - Enquanto segura a palhinha na devida posição, selar a extremidade aberta com um dispositivo de selagem SYMS.
 - Segurar a palhinha com uma pinça na área da haste de manuseamento.
 - Mergulhar rapidamente toda a palhinha no LN_2 , verticalmente. Agitar suavemente a palhinha no LN_2 durante alguns segundos, de modo a evitar a formação de uma camada de bolhas de ar isolante à volta da palhinha.
- Carregar a Cryolock da seguinte forma:
- Com uma micropipeta, carregar cuidadosamente um máximo de 2 espécimes na superfície côncava da ponta (o mesmo lado do logótipo Cryolock) a cerca de 3 mm ($1/8''$) do bordo da ponta (utilizar a marca preta como referência), removendo o eventual excesso de solução crioprotetora e deixando o menor volume de meio de vitrificação possível ($\leq 1\ \mu\text{l}$).
 - Opção A: Imediatamente e antes de mergulhar a Cryolock em LN_2 , inserir cuidadosamente a ponta na tampa, rodando-a e apertando bem até que fique fixa.
 - Opção B: Mergulhar de imediato a ponta e a tampa dentro do LN_2 . Aguardar que a formação de bolhas pare, para que se atinja o equilíbrio. Inserir cuidadosamente a ponta na tampa, rodando-a e apertando bem até que fique fixa.
- NOTA: A Opção B não está aprovada para utilização nos EUA.
- Mergulhar rapidamente a Cryolock no azoto líquido.
- NOTA: Armazenar sempre a Cryolock com a tampa virada para baixo.
11. Colocar a CryoTip, HSV straw ou Cryolock vitrificadas dentro do criotubo ou taça (na vareta de criopreservação) cheias e mergulhadas em LN_2 . Tapar o criotubo (ou taça) ou fixá-lo(a) em posição invertida com outro criotubo destapado para fixar o dispositivo vitrificado no azoto líquido.
 12. Deslocar o reservatório de LN_2 para junto do congelador de criopreservação de LN_2 e transferir a vareta de criopreservação com o respetivo conteúdo para o congelador de criopreservação, para armazenamento a longo prazo.

B. Protocolo de vitrificação de EMBRIÕES (PN a blastocisto):

Protocolo de vitrificação:

1. Dispensar asseticamente uma gota de 50 μl de ES na tampa invertida de uma placa de Petri.
 2. Retirar da incubadora a placa de cultura que contém o(s) embrião(ões) e verificar a qualidade do(s) espécime(s) ao microscópio. Quando possível, selecionar apenas o(s) embrião(ões) de melhor qualidade para vitrificação.
 3. Transferir cuidadosamente os espécimes (até dois de cada vez) com o mínimo de volume de meio da placa de cultura para a gota de ES e iniciar o temporizador.
- Os embriões devem equilibrar-se lentamente na gota de ES, por queda livre, durante 6–10 minutos.
- Nota: O espécime encolhe e, depois, retoma gradualmente o tamanho original, o que indica que atingiu o equilíbrio.
- CUIDADO: Reduzir ao mínimo a exposição do(s) espécime(s) à luz durante o equilíbrio nas gotas de ES e VS.
4. Durante o tempo de equilíbrio na solução ES:
 - Preparar uma gota de 50 μl de solução, conforme se mostra na Fig. 8, e preparar a CryoTip, HSV Straw ou Cryolock para carregamento.

Seguir o protocolo, conforme descrito anteriormente (Secção A — Protocolo de vitrificação de óócitos [MI]), dos passos 9 a 12 para exposição às soluções VS, carregamento da CryoTip, HSV Straw ou Cryolock, submersão em LN_2 e armazenamento a longo prazo.

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 Vitrifaction Freeze 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.

Como uma precaução adicional durante o procedimento de preparação, recomendamos que cada CryoTip seja cuidadosamente examinada quando retirada da embalagem. Antes da utilização, as CryoTips devem ser examinadas numa ampliação adequada (ampliação de 40x) em relação a possíveis danos (como quebras ou rachas na ponta) que possam ter ocorrido durante o transporte.

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 óocitos 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 dadores, 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 um doente, se registe 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 dadores 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.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΧΡΗΣΗΣ

Το Vit Kit-Freeze προορίζεται για χρήση σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για την υαλοποίηση και τη φύλαξη ανθρώπινων ωοκυττάρων (MI), προτυπικών (PN) ζυγίων έως εμβρύων σε στάδιο σχάσης ημέρας 3 και εμβρύων σε στάδιο βλαστοκύστης. Το kit αυτό έχει σχεδιαστεί για χρήση με το CryoTip (Αρ. καταλόγου 40709) και το kit Απόψυξης Υαλοποίησης (Vit Kit-Thaw) για τη βέλτιστη αποκατάσταση των δειγμάτων.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το **Equilibration Solution-ES** είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Μέσου-199, το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη, 7,5% (κ.ό.) από κάθε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και αιθυλενογλυκόλη και 20% (κ.ό.) συμπληρώμα ορού δεξτράνης (DSS).

Το **Vitrification Solution-VS** είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα HEPES Μέσου-199, το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη, 15% (κ.ό.) από κάθε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και αιθυλενογλυκόλη, 20% (κ.ό.) συμπληρώμα ορού δεξτράνης (DSS) και 0,5 M σακχαρόζη.

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-Freeze για επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 10 mg/mL HSA και 4 mg/mL δεξτράνης.

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

ΣΥΝΘΕΣΗ

Άλατα και ιόντα

Χλωριούχο νάτριο
Φωσφορικό νάτριο
Χλωριούχο κάλιο
Θειικό μαγνήσιο
Οξικό νάτριο
Χλωριούχο ασβέστιο
Χλωριούχος χολίνη
Νιτρικός σίδηρος

Ρυθμιστικό διάλυμα

Διττανθρακικό νάτριο
HEPES

Δείκτης pH

Ερυθρό της φαινόλης

Αμινοξέα

Αργινίνη
Γλυκίνη
Ιστιδίνη
Λυσίνη
Προλίνη

Τυροσίνη
Αλανίνη
Ασπαρτικό οξύ
Γλουταμικό οξύ
Ισολευκίνη
Λευκίνη
Μεθειονίνη
Φαινυλαλανίνη
Σερίνη
Θρεονίνη
Τρυπτοφάνη
Βαλίνη
Υδρογυπρολίνη
Κυστίνη
Κυστεΐνη

Αντιοξειδωτικό

Γλουταθειόνη

Άλλα

Θειική αδενίνη
Δεοξυριβόζη

Ριβόζη
Γουανίνη
Ουρακίλη
Ξανθίνη
Θυμίνη
Υποξανθίνη
Αδενοσίνη

Βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία

Καλσιφερόλη
Ασκαρβικό οξύ
Αμινοβενζοϊκό οξύ
Νικοτινικό οξύ
Αμιδίο νικοτινικού οξέος
Παντοθενικό οξύ
Ριβοφλαβίνη
Θειαμίνη
Βιοτίνη
Πυριδοξίνη

Διθειώδες νάτριο
Φυλλικό οξύ
Άλφα τοκοφερόλη

Αντιβιοτικά

Θειική γενταμικίνη

Ενεργειακά υποκατάστατα

Γλυκόζη
Ινοσιτόλη

Πρωτεΐνη

Ανθρώπινη αλβουμίνη ορού

Κρυοπροστατευτικό υλικό

Δεξτράνη
Σακχαρόζη
Αιθυλενογλυκόλη
Διμεθυλοσουλφοξείδιο

Νερό

Ποιότητα ενέσιμου
ύδατος (WFI)

ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

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

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

Διαλύματα και CryoTip.

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

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

Στεριρότητα μέσω της τρέχουσας δοκιμασίας στεριρότητας κατά USP <71> (Επιτυχής)

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

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (Αρ. καταλόγου 40709) ή Παγέτα HSV (Αρ. καταλόγου 25246-25251) ή Cryolock™ (Αρ. καταλόγου CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Σύνδεσμος Irvine Scientific, LLC (Αρ. καταλόγου 40736) ή άλλος προσαρμογέας
- Στείρα τρυβλία petri (50 X 9 mm, Falcon 351006 ή ισοδύναμο)
- Κρυοσωληνάρια (4,5 mL) ή κρυοσωλήνες και κρυοράβδοι
- Τροποποιημένο μέσο καλλιέργειας HTF - HEPES (Αρ. καταλόγου 90126) συμπληρωμένο με πρωτεΐνη
- Υαλουρινιδάση (Αρ. καταλόγου 90101)
- Αναλώσιμα γάντια
- Σύριγγα Hamilton GASTIGHT® (50 μ L, Αρ. καταλόγου 80901) ή άλλο εργαλείο αναρρόφησης
- Πιπέτες μεταφοράς (πιπέτες από γυαλί διαμορφωμένο με έλξη ή άκρα μικροπιπеты με εσωτερική διάμετρο άκρου ~200 μ m)
- Λαβίδα
- Θερμοκολλητής ώσης

- Σφραγιστής SYMS για την παγιέτα HSV
- Χρονόμετρο ή χρονοδιακόπτης
- Δεξαμενή υγρού αζώτου (δοχείο Ντιούαρ 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]

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Απαιτήσεις εξαρτημάτων Vit Kit-Freeze (ανάλογα με την εφαρμογή):

- Equilibration Solution (ES):
60 μL για το πρωτόκολλο υαλοποίησης ωκυττάρων
H
50 μL για το πρωτόκολλο υαλοποίησης εμβρύων
- Vitrification Solution (VS):
50 μL για πρωτόκολλο υαλοποίησης
- 1 CryoTip ή παγιέτα HSV ή Cryolock (φυλάσσει έως 2 δείγματα)
- 1 Σύνδεσμος

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗΣ:

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 της εξισορρόπησης στα διαλύματα ES και VS.

1. Φέρετε την ποσότητα των διαλυμάτων ES και VS που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (20-27 °C). **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Αποφεύγετε να φέρνεται ολόκληρα τα φιαλίδια των διαλυμάτων ES και VS σε θερμοκρασία δωματίου επανειλημμένα, κάθε φορά που χρειάζεται κάποιο μέρος του διαλύματος. 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. Για το πρωτόκολλο υαλοποίησης ωκυττάρου απαιτείται επίσης το τροποποιημένο HTF (HEPES) με πρωτεΐνη.
2. Πληρώστε τη δεξαμενή υγρού αζώτου με υγρό άζωτο (επαρκές για να επιτευχθεί βάθος 4 ιντσών (10 cm) ή για την πλήρη εμβύθιση του κρυοσωληναρίου που υπάρχει επάνω στη ράβδο) και τοποθετήστε κοντά στο μικροσκόπιο. Προσαρτήστε ένα κρυοσωληνάριο ή μια κρυοράβδο (χωρίς το πώμα) στον κάτω σφιγκτήρα μιας κρυοράβδου και εμβυθίστε στο υγρό άζωτο, για την προετοιμασία των υαλοποιημένων δειγμάτων για φύλαξη.
3. Προσδιορίστε τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να υαλοποιηθούν.
4. Επισημάνετε κάθε αποστειρωμένο τρυβλίο petri (ή καπάκι) και τη συσκευή φύλαξης κρυοσυντήρησης με τις απαραίτητες πληροφορίες.
5. Ανατρέψτε με ήπιες κινήσεις κάθε φιαλίδιο ES και VS δύο φορές για να αναμιχθούν τα περιεχόμενα, πριν από τη χρήση.
6. Προτοιμάστε το τρυβλίο με σταγόνες διαλυμάτων για τη διαδικασία υαλοποίησης, ως εξής:

A. Πρωτόκολλο υαλοποίησης ΩΚΥΤΤΑΡΩΝ (MII):

ΣΗΜΕΙΩΣΗ 1: Τα ανακτημένα ωκύτταρα πρέπει να απογυμνώνονται με υαλουρονιδάση, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι MII.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ 2: Ανατρέξτε στην Ενότητα Β για το πρωτόκολλο υαλοποίησης εμβρύων.

1. Διανείμετε με άσηπτη τεχνική μια σταγόνα 20 μL από το μέσο καλλιέργειας, το τροποποιημένο HTF - HEPES με πρωτεΐνη και το ES σε στενή εγγύτητα επάνω σε ένα ανεστραμμένο καπάκι στείρου τρυβλίου petri, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 και τοποθετήστε το τρυβλίο στην τράπεζα του μικροσκοπίου:
 - μία σταγόνα 20 μL του τροποποιημένου HTF (HEPES με πρωτεΐνη)
 - τρεις σταγόνες 20 μL (60 μL συνολικά) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Απομακρύνετε το τρυβλίο καλλιέργειας που περιέχει τα ωκύτταρα MII από τον επωαστήρα και ελέγξτε την ποιότητα των δειγμάτων στο μικροσκόπιο. Όπου είναι δυνατόν, επιλέγεται μόνο το ή τα ωκύτταρα σταδίου MII της καλύτερης ποιότητας. **ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ:** Περιορίζετε στο ελάχιστο την έκθεση του ή των δειγμάτων στο φως κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης στις σταγόνες H, ES και VS.
3. Μεταφέρετε τα ωκύτταρα (έως 2 κάθε φορά) με ελάχιστο όγκο μέσου από το τρυβλίο καλλιέργειας (στον επωαστήρα) στη σταγόνα 20 μL H επί ένα λεπτό.
4. Αναμίξτε τη σταγόνα H με τη σταγόνα ES1 (βλ. Εικ. 1, βέλος 1) με το άκρο της πιπέτας μεταφοράς και επιτρέψτε να γίνει αυθόρμητη ανάμειξη των δύο διαλυμάτων, επί 2 λεπτά.
5. Στη συνέχεια, αναμειγνύει τη σταγόνα ES2 (βέλος 2) με το μείγμα των προηγούμενων σταγόνων και αφήστε επί 2 λεπτά.
6. Μεταφέρετε το ή τα ωκύτταρα με ελάχιστο όγκο διαλύματος από την αναμειγμένη σταγόνα στη σταγόνα ES3 επί 6-10 λεπτά. **Σημείωση:** Η εξισορρόπηση του ή των ωκυττάρων στο ES3 ολοκληρώνεται όταν το πάχος της διαφανούς ζώνης και του περιελκυστικού χώρου είναι ίσο. Το ή τα ωκύτταρα θα καθίζουν στον πυθμένα της σταγόνας εντός 3 λεπτών.
7. Κατά τη διάρκεια του χρόνου εξισορρόπησης στο ES3:

Διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία (1) σταγόνα 50 μL του VS 2 λεπτά πριν από την πλήρη εξισορρόπηση και προτοιμάστε για φόρτωση το CryoTip (Εικ. 3), την παγιέτα HSV (Εικ. 4) ή το Cryolock (Εικ. 5):

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Εξετάστε προσεκτικά τη συσκευή υαλοποίησης και το άκρο, πριν από την έναρξη της διαδικασίας.

 - CryoTip: συνδέστε στη σύριγγα Hamilton ή σε κατάλληλο εργαλείο αναρρόφησης χρησιμοποιώντας έναν σύνδεσμο ή έναν προσαρμογέα, ώστε να διασφαλιστεί καλή σφράγιση. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Διατηρήστε το μεταλλικό χιτώνιο κάλυψης επάνω από το διαμορφωμένο με έλξη λεπτό άκρο ώστε να προστατεύεται έως ότου είναι έτοιμο για τη φόρτωση των δειγμάτων.
 - Παγιέτα HSV: συνδέστε το μακρύ άκρο της μπλε πλαστικής συσκευής εισαγωγής στο έγχρωμο άκρο της ράβδου χειρισμού.
 - Cryolock: αποκολλήστε το πώμα.

8. Τα ακόλουθα βήματα (9-13) θα πρέπει να ολοκληρωθούν εντός 80-110 δευτερολέπτων. ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ: Η έκθεση των δειγμάτων στο διάλυμα VS θα πρέπει να περιορίζεται, προκειμένου να αποτρέπεται η κυτταροτοξικότητα. Το ή τα δείγματα τείνουν να επιπλέουν στο VS, οπότε ρυθμίστε την εστίαση του μικροσκοπίου, ώστε να έχετε συνεχώς εικόνα κατά τη διάρκεια της έκθεσης και διατηρήστε το άκρο της πιπέτας μεταφοράς κοντά, προκειμένου να εξασφαλίζεται η ταχεία μεταφορά μεταξύ των σταγόνων VS. Ανατρέξτε στην Εικόνα 6.
 9. Αφού ολοκληρωθεί η εξισορρόπηση στο ES, αναρροφήστε μια ποσότητα ES στην πιπέτα μεταφοράς και μεταφέρετε το ή τα δείγματα με ελάχιστο όγκο από τη σταγόνα του ES στη σταγόνα του VS για 30 δευτερόλεπτα.
 10. Φορτώστε και θερμοκολλήστε το CryoTip ως εξής (βλ. Εικόνα 7α):
 - Σύρετε το μεταλλικό χιτώνιο κάλυψης προς τα επάνω κατά μήκος του CryoTip ώστε να αποκαλύψετε το λεπτό εύθραυστο άκρο.
 - Χειρίζομενοι το CryoTip και τη σύριγγα Hamilton ενώ παρατηρείτε στο μικροσκόπιο, αναρροφήστε προσεκτικά έναν μικρό όγκο του VS έως την ένδειξη αρ. 1 του CryoTip.
 - Συνεχίστε την παρατήρηση στο μικροσκόπιο και αναρροφήστε με ήπιες κινήσεις το δείγμα με το VS έως την ένδειξη αρ. 2 του CryoTip.
 - Τώρα παρατηρήστε απευθείας το CryoTip και αναρροφήστε περισσότερο VS έως την ένδειξη αρ. 3.
 - Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ της ένδειξης αρ. 2 και της ένδειξης αρ. 3.
 - Θερμοκολλήστε (σφραγίστε αρ. 1) το CryoTip στην ένδειξη αρ. 1 (ή ακριβώς κάτω από αυτήν) και σύρετε το χιτώνιο κάλυψης πάλι προς τα κάτω, ώστε να καλύπτει και να προστατεύει το λεπτό εύθραυστο άκρο.
 - Αφαιρέστε προσεκτικά το CryoTip από το εργαλείο αναρρόφησης και τον προσαρμογέα και, στη συνέχεια, θερμοκολλήστε (σφραγίστε αρ. 2) στο παχύ άκρο του CryoTip, πάνω από την ένδειξη αρ. 4.
 - Βυθίστε το καλυμμένο CryoTip απευθείας σε υγρό άζωτο (ψύξη με ρυθμό $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$) (βλ. Εικόνα 7β).
- Φορτώστε και σφραγίστε την παγιέτα HSV ως εξής:
- Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα, εναποθέστε με προσοχή το ή τα δείγματα στην αύλακα της τριχοειδικής ράβδου σε απόσταση 1 mm από το άκρο. Η σταγόνα που περιέχει το ή τα δείγματα πρέπει να έχει όγκο μικρότερο από 0,5 μl. Σε κάθε τριχοειδική ράβδο επιτρέπονται το πολύ 2 ωκύτταρα ή έμβρυα.
 - Τοποθετήστε αμέσως την τριχοειδική ράβδο και το εργαλείο χειρισμού μέσα στην παγιέτα και ωθήστε, έως ότου το τετράγωνο τμήμα του εργαλείου χειρισμού έρθει σε επαφή με το διευρυμένο άκρο της παγιάτας.
 - Τσιμπήστε ελαφρά την παγιάτα με τον αντίχειρα και τον δάκτυλό σας και αφαιρέστε τη συσκευή εισαγωγής.
 - Ενώ συγκρατείτε την παγιάτα στη θέση της, σφραγίστε το ανοικτό άκρο χρησιμοποιώντας έναν σφραγιστή SYMS.
 - Κρατήστε την παγιάτα χρησιμοποιώντας λαβίδα στην περιοχή της ράβδου χειρισμού.
 - Βυθίστε γρήγορα ολόκληρη την παγιάτα κατακόρυφα στο LN₂. Ανακατέψτε με ήπιες κινήσεις την παγιάτα στο LN₂ για μερικά δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ενός στρώματος φυσαλίδων αέρα γύρω από την παγιάτα.
- Φορτώστε το Cryolock ως εξής:
- Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα, φορτώστε προσεκτικά 2 δείγματα το μέγιστο στην κοίλη επιφάνεια του άκρου (στην ίδια πλευρά με το λογότυπο Cryolock), σε απόσταση περίπου 3 mm (1/8") από το άκρο, (χρησιμοποιήστε τη μαύρη ένδειξη ως αναφορά), απομακρύνοντας κάθε περίσσεια του διαλύματος κρουπροστασίας και αφήνοντας όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο του μέσου υαλοποίησης ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$).
 - Επιλογή Α: Αμέσως και πριν από την εμβύθιση του Cryolock στο LN₂, εισαγάγετε προσεκτικά το άκρο στο πώμα, περιστρέφοντας ελαφρά έως ότου στερεωθεί.
 - Επιλογή Β: Εμβυθίστε αμέσως το άκρο και το πώμα στο LN₂. Περιμένετε να σταματήσει ο σχηματισμός φυσαλίδων για την εξισορρόπηση. Εισαγάγετε προσεκτικά το άκρο στο πώμα, περιστρέφοντας ελαφρά έως ότου στερεωθεί.
- ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η επιλογή Β δεν έχει λάβει έγκριση για χρήση στις Η.Π.Α.
- Βυθίστε γρήγορα το Cryolock στο υγρό άζωτο.
- ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Φυλάσσετε πάντα το Cryolock με το πώμα στραμμένο προς τα κάτω.
11. Τοποθετήστε το υαλοποιημένο CryoTip, την παγιάτα HSV ή το Cryolock μέσα στο εμβυθισμένο, πληρωμένο με LN₂ κρουσωληνάριο ή κύπελλο (επάνω στην κρουράβδο). Πωματίστε το κρουσωληνάριο (ή το κύπελλο) ή προσαρτήστε ανάποδα σε έναν άλλο, μη πωματισμένο κρουσωληνάριο, προκειμένου να στερεώσετε την υαλοποιημένη συσκευή μέσα στο υγρό άζωτο.
 12. Μετακινήστε τη δεξαμενή LN₂ πλησιέστερα στον κρουκαταψύκτη LN₂ και μεταφέρετε την κρουράβδο με τα περιεχόμενα στον κρουκαταψύκτη, για μακροχρόνια φύλαξη.
- B. ΕΜΒΡΥΑ (PN σε βλαστοκύστη):**
- Πρωτόκολλο υαλοποίησης:
1. Διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία σταγόνα 50 μl ES σε ένα ανεστραμμένο κατάκι ενός τρυβλίου Petri.
 2. Απομακρύνετε το τρυβλίο καλλιέργειας που περιέχει το ή τα έμβρυα από τον επωαστήρα και ελέγξτε την ποιότητα του ή των δειγμάτων στο μικροσκόπιο. Όπου είναι δυνατόν, επιλέγεται μόνο το ή τα έμβρυα της καλύτερης ποιότητας για υαλοποίηση.
 3. Μεταφέρετε προσεκτικά το δείγμα (έως δύο κάθε φορά) με ελάχιστο όγκο μέσου από το τρυβλίο καλλιέργειας στη σταγόνα ES και εκκινήστε το χρονόμετρο.
- Τα έμβρυα θα πρέπει να εξισορροπούνται στη σταγόνα ES αργά, με ελεύθερη πτώση επί 6-10 λεπτά.
- Σημείωση: Το δείγμα θα συρρικνωθεί και, στη συνέχεια, θα ανακτήσει σταδιακά το αρχικό του μέγεθος, πράγμα που υποδεικνύει ότι η εξισορρόπηση έχει ολοκληρωθεί.
- ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ: Περιορίζετε στο ελάχιστο την έκθεση του ή των δειγμάτων στο φως κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης στις σταγόνες ES και VS.
4. Κατά τη διάρκεια του χρόνου εξισορρόπησης στο ES:
 - Ετοιμάστε μία σταγόνα 50 μl του διαλύματος VS όπως φαίνεται στην Εικ. 8 και προετοιμάστε το CryoTip, την παγιάτα HSV ή το Cryolock για φόρτωση.

Ακολουθήστε το πρωτόκολλο όπως αναγράφεται παραπάνω [Ενότητα Α - Πρωτόκολλο υαλοποίησης ωκυττάρων (MII)] από τα βήματα 9 έως 12 για την έκθεση σε διαλύματα VS, τη φόρτωση του CryoTip, την παγίετα HSV ή Cryolock, την βύθιση σε LN₂ και τη μακροχρόνια φύλαξη.

Για πρόσθετες λεπτομέρειες σχετικά με τη χρήση των προϊόντων αυτών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να συμβουλευείται 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 Vitrifaction Freeze 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.

Ως πρόσθετη προφύλαξη κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας, συνιστούμε κάθε CryoTip να εξετάζεται προσεκτικά όταν αφαιρείται από τη συσκευασία. Πριν από τη χρήση, τα CryoTip θα πρέπει να εξετάζονται με κατάλληλη μεγέθυνση (μεγεθυντική ισχύς 40x) για πιθανές ζημιές (όπως θραύση ή ρωγμές στο άκρο) που μπορεί να έχουν συμβεί κατά τη μεταφορά.

Μη χρησιμοποιείτε οποιοδήποτε φιαλίδιο διαλύματος που παρουσιάζει ενδείξεις ζημιές, 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 δοτών, τη διαλογή μεμονωμένων δωρεών και τη δημιουργία δεξαμενών πλάσματος για συγκεκριμένους δείκτες λοίμωξης, καθώς και τη συμπερίληψη αποτελεσματικών βημάτων κατά την παρασκευή για την αδρανοποίηση/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 προδιαγραφές 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 εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) κιτ 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 μέθοδος 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 δυνατό να μεταδώσουν λοίμωξη, εφαρμόζοντας γενικές προφυλάξεις. Οι δότες του αρχικού υλικού έχουν επίσης εξεταστεί για νόσο Creutzfeldt-Jakob (CJD).

ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΗ

Το προϊόν περιέχει θειική 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

Souprava Vit Kit-Freeze je určena pro postupy asistované reprodukce k vitifikaci a uchovávání lidských oocytů (MII), pronukleárních (PN) zygot do úrovně embrya ve stádiu rýhování 3. dne a embryí ve stádiu blastocysty. Tato souprava je navržena k použití se systémem CryoTip (katalogové č. 40709) a vitrifikační rozmrazovací soupravou (Vit Kit-Thaw), se kterými dosáhnete optimální obnovy vzorků.

POPIS PROSTŘEDKU

Ekvilibrační roztok **Equilibration Solution-ES** je HEPES pufovaný roztok média Medium-199 obsahující gentamicin sulfát, 7,5 % (v/v) dimethylsulfoxidu (DMSO) a ethylenglykolu a 20 % (v/v) doplňku Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrifikační roztok **Vitrification Solution-VS** je HEPES pufovaný roztok média Medium-199 obsahující gentamicin sulfát, 15 % (v/v) DMSO a ethylenglykolu, 20 % (v/v) DSS a 0,5 M sacharózy.

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-Freeze používá při 20 % (v/v) k dosažení konečné koncentrace 10 mg/ml HSA a 4 mg/ml dextranu.

Tyto dva roztoky se používají v pořadí podle kroků protokolu vitifikace mikrokapek.

SLOŽENÍ

Soli a ionty

Chlorid sodný
Fosforečnan sodný
Chlorid draselný
Síran hořečnatý
Octan sodný
Chlorid vápenatý
Cholinchlorid
Dusičnan železitý

Prolin
Tyrosin
Alanin
Kyselina asparagová
Kyselina glutamová
Isoleucin
Leucin
Methionin
Fenylalanin
Serin

Pufr

Hydrogenuhlíčan sodný
HEPES

Indikátor pH

Fenolová červen

Aminokyseliny

Arginin
Glycin
Histidin
Lysin

Threonin
Tryptofan
Valin
Hydroxyprolin
Cystin
Cystein

Antioxidant

Glutathion

Ostatní

Adeninsulfát
Deoxyribóza
Ribóza
Guanin
Uracil
Xantin
Thymin
Hypoxantin
Adenosin

Vitaminy a minerály

Kalciferol
Kyselina askorbová
Kyselina aminobenzoová
Kyselina nikotinová
Amid kyseliny nikotinové
Kyselina pantothenová
Riboflavin
Thiamin
Biotin

Pyridoxin
Hydrogensířičitan sodný
Kyselina listová
Alfa-tokoferol

Antibiotika

Gentamicin-sulfát

Energetické substráty

Glukóza
Inositol

Protein

Lidský sérový albumin

Kryoprotektant

Dextran
Sacharóza
Ethylenglykol
Dimethylsulfoxid

Voda

V kvalitě vody pro injekci

ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

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

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

Roztoky a tyčinky CryoTip

Na endotoxiny testem Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Test na myších embryích (jednobuněčné při ≥ 80 % expandované blastocysty)

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.

POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Tyčinka CryoTip (kat. č. 40709) nebo kapilára HSV (kat. č. 25246-25251) nebo systém Cryolock™ (kat. č. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O) společnosti Irvine Scientific, LLC
- Konektor společnosti Irvine Scientific, LLC (kat. č. 40736) nebo jiný adaptér
- Sterilní Petriho misky (50 × 9 mm, Falcon 351006 nebo ekvivalentní)
- Kryozkumavky (4,5 ml) nebo zásobníky a držáky
- Modifikované kultivační médium Modified HTF - HEPES (kat. č. 90126) se suplementací proteinu
- Hyaluronidáza (kat. č. 90101)
- Jednorázové rukavice
- Injekční stříkačka Hamilton GASTIGHT® (50 µl, katalogové č. 80901) nebo jiný aspirační nástroj
- Transferové pipety (skleněné pipety z taženého skla nebo mikropipetové hroty s vnitřním průměrem hrotu ~200 µm)
- Pinzeta nebo kleště
- Tepelná svářečka Impulse
- Svářečka SYMS pro kapiláry HSV

- 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)

NÁVOD K POUŽITÍ

Potřebné složky soupravy Vit Kit-Freeze (na aplikaci):

- Ekvilibrační roztok Equilibration Solution (ES):
60 µl pro protokol vitifikace oocytů
nebo
50 µl pro protokol vitifikace embryí
- Vitrikační roztok Vitricification Solution (VS):
50 µl pro protokol vitifikace
- 1 tyčinka CryoTip nebo kapilára HSV Straw nebo Cryolock (k uložení až 2 vzorků)
- 1 konektor

PROTOKOL VITRIKACE:

POZNÁMKA: Postupy se provádějí při pokojové teplotě (20–27 °C). Pro níže uvedené postupy NEPOUŽÍVEJTE vyhřívaný stolek mikroskopu. POZOR: Při ekvilibraci v roztocích ES a VS minimalizujte expozici vzorku světlu.

1. Nechte množství ES a VS, které má být použito, dosáhnout pokojové teploty (20–27 °C). **POZNÁMKA:** Nenechte celé lahvičky ES a VS opakovaně zahřívat na pokojovou teplotu, pokud budete potřebovat vždy jen část těchto roztoků. Lepší je odměřit množství, které se má použít, a lahvičky po odměření ihned vrátit do prostoru o teplotě 2–8 °C. Pro protokol vitifikace oocytů je také potřeba Modified HTF (HEPES) s proteinem.
2. Naplňte nádobu na kapalný dusík kapalným dusíkem (použijte objem postačující k dosažení hloubky 4 palců [10 cm] nebo k úplnému ponoření kryozkumavky na držáku) a umístěte do blízkosti mikroskopu. Připevňte kryozkumavku nebo zásobník (neuzavřený víčkem) ke spodní svorce držáku a ponořte do kapalného dusíku, abyste je připravili k uložení vitrifikovaných vzorků.
3. Stanovte počet vzorků k vitifikaci.
4. Vyznačte nezbytné informace na štítku každé Petriho misky (nebo víčka) a prostředku ke kryouchování.
5. Opatrným dvojným převrácením promíchejte před použitím obsah každé lahvičky ES a VS.
6. Postup přípravy misky s kapíčkami roztoků pro vitifikaci:

A. Protokol vitifikace OOCYTŮ (MII):

POZNÁMKA 1: Odebrané oocyty se denudují hyaluronidázou, aby se potvrdilo, že jsou MII.

POZNÁMKA 2: Protokol vitifikace embryí naleznete v části B.

1. Asepticky nadávkuje 20µl kapky kultivačního média, Modified HTF - HEPES s proteinem a ES (v těsné vzájemné blízkosti) na obrácené víčko sterilní Petriho misky podle ilustrace na obr. 1 a misku umístěte na stolek mikroskopu:
 - jedna 20µl kapka Modified HTF (HEPES s proteinem)
 - tři 20µl kapky (celkem 60µl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Vymějte kultivační misku s MII oocyty z inkubátoru a zkontrolujte kvalitu vzorků pod mikroskopem. Pokud je to možné, vyběřte pouze nejkalitnější oocyt(y) fáze MII.
POZOR: Při ekvilibraci v kapkách H, ES a VS minimalizujte expozici vzorku (vzorků) světlu.
3. Přeneste oocyt (až 2 najednou) s minimálním objemem média z kultivační misky (v inkubátoru) na jednu minutu do 20µl kapky H.
4. Hrotem transferové pipety připojte kapku H do ES1 (viz obr. 1, šipka 1) a nechte oba roztoky spontánně promíchávat po dobu 2 minut.
5. Potom připojte kapku ES2 (šipka 2) ke dříve spojeným kapkám a ponechte 2 minuty.
6. Přeneste oocyt(y) s minimálním objemem roztoku ze spojené kapky do kapky ES3 na dobu 6–10 minut. **Poznámka:** ekvilibrace oocytu (oocytů) v ES3 je dokončena, když zona pellucida a perivitellinní prostor mají stejnou tloušťku. Oocyt(y) se do 3 minut usadí na dně kapky.
7. Během doby ekvilibrace v ES3:
2 minuty před dokončením ekvilibrace asepticky nadávkuje jednu (1) 50µl kapku VS a připravte k založení tyčinku CryoTip (obr. 3), kapiláru HSV Straw (obr. 4) nebo systém Cryolock (obr. 5):
POZNÁMKA: Před zahájením postupu pečlivě prohlédněte vitrikační prostředek a hrot.
 - CryoTip: pomocí konektoru nebo adaptéru natěsno připojte ke stříkačce Hamilton nebo vhodnému aspiračnímu nástroji.
POZNÁMKA: Nechte kovový kryt chránit jemný hrot, dokud nebudete připraveni natáhnout vzorek.
 - HSV Straw: připojte delší konec modrého plastového zaváděcího zařízení do barevného konce manipulační tyčinky.
 - Cryolock: odpojte krytku.
8. Následující kroky (9–13) je třeba provést za 80–110 sekund. **POZOR:** V zájmu prevence cytotoxicity je třeba omezit expozici vzorků VS. Vzorky mají tendenci ve VS plavat, proto zaostřete mikroskop, abyste je mohli nepřetržitě sledovat během expozice, a udržujte hrot transferové pipety v jejich blízkosti, abyste zajistili rychlý přenos mezi kapkami VS. Viz obr. 6.
9. Po dokončení ekvilibrace v ES odeberte malé množství ES do transferové pipety a přeneste vzorek (vzorky) s minimálním objemem kapky ES na 30 vteřin do kapky VS.
10. Dále uvedeným postupem naplňte a tepelně svařte tyčinku CryoTip (viz obr. 7a):
 - Vysunutím kovového ochranného krytu nahoru po tyčince CryoTip odkryjte jemný křehký hrot.
 - Sledujte tyčinku CryoTip a stříkačku Hamilton pod mikroskopem a opatrně aspirujte malý objem VS po značku č. 1 na tyčince CryoTip.
 - Za stálého sledování pod mikroskopem opatrně aspirujte vzorek s VS po značku č. 2 na tyčince CryoTip.

- Nyní tyčinku CryoTip sledujte přímo a aspirujte dodatečný roztok VS po značku č. 3.
- Vzorek se musí nacházet mezi značkami č. 2 a 3.
- Tepelně svařte (svar č. 1) tyčinku CryoTip na značce č. 1 (nebo těsně pod ní) a stáhněte ochranný kryt zpět dolů, aby chránil jemný křehký hrot.
- Opatrně tyčinku CryoTip vyjměte z aspiračního nástroje a adaptéru a potom tepelně svařte (svar č. 2) na silnějším konci tyčinky CryoTip nad značkou č. 4.
- Ponořte zakrytou tyčinku CryoTip přímo do kapalného dusíku (ochlazení rychlostí –12 000 °C/min.) (viz obr. 7b).

Kapiláru HSV založte a svařte tímto postupem:

- Pomocí mikropipety opatrně uložte vzorek (či vzorky) do kanálku kapilárové tyčinky ve vzdálenosti 1 mm od konce. Kapka obsahující vzorek (vzorky) musí být menší než 0,5 µl. Maximálně 2 oocytů nebo embrya na jednu kapilárovou tyčinku.
- Kapilárovou tyčinku a manipulátor okamžitě vložte do kapiláry a zasouvejte, dokud se obdélníková část manipulátoru nedostane do kontaktu s rozšířeným koncem kapiláry.
- Jemně stiskněte kapiláru palcem a ukazovákem a vytáhněte zavaděcí zařízení.
- Držte kapiláru na místě a svařtečkou SYMS svařte její otevřený konec.
- Držte kapiláru pinzetou v oblasti manipulační tyčinky.
- Rychle celou kapiláru ve vislé poloze ponořte do tekutého dusíku (LN₂). Jemně kapilárou v LN₂ několik sekund pohybuje, abyste zabránili tvorbě izolující vrstvy vzduchových bublinek kolem ní.

Systém Cryolock založte tímto způsobem:

- Pomocí mikropipety opatrně založte maximálně 2 vzorky na konkávní povrch hrotu (strana s logem Cryolock), přibližně 3 mm (1/8") od okraje hrotu (jako referenční bod poslouží černá značka). Odstraňte při tom přebytečný roztok kryoprotektantu a ponechte co nejméně vitrificačního média (≤ 1 µl).
- Možnost A: Okamžitě a předtím, než Cryolock ponoříte do LN₂, opatrně zasuňte hrot do krytky a otáčením pevně dotáhněte.
- Možnost B: Okamžitě hrot a krytku ponořte do LN₂. Počkejte, dokud se nepřestanou tvořit bublinky, abyste nechali proběhnout ekvilibraci. Opatrně zasuňte hrot do krytky a otáčejte, dokud není dostatečně pevně připojen.

POZNÁMKA: Možnost B není schválena k použití v USA.

- Cryolock rychle ponořte do tekutého dusíku.

POZNÁMKA: Cryolock vždy skladujte s krytkou směrem dolů.

11. Vložte vitrifikovanou tyčinku CryoTip, kapiláru HSV Straw nebo Cryolock do ponořené, LN₂ vyplněné kryozkumavky nebo zásobníku (na držáku). Uzavřete kryozkumavku (nebo zásobník) víčkem nebo připojte v převrácené poloze k jinému víčkem neuzavřené kryozkumavce, aby vitrifikovaný prostředek byl zajištěn v kapalném dusíku.
12. Přesuňte nádobu s LN₂ do blízkosti kryomrazničky s LN₂ a přeneste držák s obsahem do kryomrazničky k dlouhodobému skladování.

B. EMBRYA (PN až blastocysta):

Protokol vitrifikace:

1. Asepticky nadávkuje jednu 50µl kapku ES na obrácené víčko Petriho misky.
2. Vyjměte kultivační misku s embryem (embryi) z inkubátoru a zkontrolujte kvalitu vzorku (vzorků) pod mikroskopem. Pokud je to možné, vybírejte k vitrifikaci pouze nej kvalitnější embryo (embrya).
3. Opatrně přeneste vzorek (až dva najednou) s minimálním objemem média z kultivační misky do kapky ES a spusťte časovač. Embrya se pomalu ekvilibrují v kapce ES volným pádem 6–10 minut.
Poznámka: Vzorek se smrští a potom postupně navrátí na svou původní velikost, což značí, že ekvilibrace je hotová.
POZNÁMKA: Při ekvilibraci v kapkách ES a VS minimalizujte expozici vzorku (vzorků) světlu.
4. Během doby ekvilibrace v ES:
 - připravte jednu 50µl kapku roztoku VS podle ilustrace na obr. 8 připravte tyčinku CryoTip, kapiláru HSV Straw nebo systém Cryolock k založení.

Postupujte podle výše uvedeného protokolu (část A – Protokol vitrifikace OOCYTŮ [MIII]) od kroku 9 do kroku 12 s ohledem na expozici roztokům VS, založení tyčinky CryoTip, kapiláry HSV Straw nebo systému Cryolock, ponoření do LN₂ a dlouhodobé skladování.

Další informace o použití těchto výrobků každá laboratoř 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 Freeze Kit stabilní do dat expirace uvedených na štítcích lahvíček.

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.

Jako další bezpečnostní opatření doporučujeme v přípravné fázi pečlivě každou tyčinku CryoTip při vybalení prohlédnout. Při dostatečném zvětšení (40×) je třeba zkontrolovat, zda tyčinky CryoTip nevykazují poškození (např. ulomení nebo praskliny hrotů), k němuž mohlo dojít během přepravy.

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

Abyste 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 zafixování 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 objevených virů a jiných patogenů. U albuminu vyráběného zavedenými postupy podle specifikací Evropského lékopisu nebyly hlášeny žádné případy prokázaného přenosu virů. Pokaždé, když je pacientce podáno kulturační 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-Freeze er beregnet til brug i assisteret reproduktionsprocedurer til vitrificering og opbevaring af humane oocytter (MI), pronukleære (PN) zygoter til dag 3 embryoner på cleavage stadiet og embryoner på blastocyststadiet. Dette kit er fremstillet til brug sammen med CryoTip (katalognr. 40709) og Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) for optimal gendannelse af prøver.

BESKRIVELSE AF PRODUKTET

Equilibration Solution-ES er en HEPES-bufferet opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat, 7,5 % (v/v) af hvert DMSO og ethylenglycol og 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS er en HEPES-bufferet opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat, 15% (v/v) af hvert DMSO og ethylenglycol, 20 % (v/v) DSS og 0,5 M sakkarose.

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-Freeze for at få en endelig koncentration på 10 mg/ml HSA og 4 mg/ml dextran.

Disse to opløsninger skal anvendes i rækkefølge iht. den trinvis protokol for vitrificering af mikrodråber.

SAMMENSÆTNING

Salte og ioner

Natriumklorid
Natriumfosfat
Kaliumklorid
Magnesiumsulfat
Natriumacetat
Kalciumklorid
Kolinklorid
Ferrinitrat

Buffer

Natriumbikarbonat
HEPES

pH-indikator

Rød fenol

Aminosyrer

Arginin
Glycin
Histidin
Lysin

Prolin
Tyrosin
Alanin
Asparaginsyre
Glutaminsyre
Isoleucin
Leucin
Methionin
Phenylalanin
Serin
Threonin
Tryptofan
Valin
Hydroxyprolin
Cystin
Cystein

Antioxidant

Glutathion

Andet

Adeninsulfat
Deoxyribose
Ribose
Guanin
Uracil
Xanthin
Thymin
Hypoxanthin
Adenosin

Vitaminer og mineraler

Calciferol
Ascorbinsyre
Aminobenzoesyre
Nikotinsyre
Nikotinsyreamid
Pantothensyre
Riboflavin
Thiamin
Biotin

Pyridoxin
Natriumbisulfid
Folinsyre
Alfa-tokoferol

Antibiotikum

Gentamicinsulfat

Energisubstrater

Glukose
Inositol

Protein

Humant serumalbumin

Kryoprotektant

Dextran
Sakkarose
Ethylenglycol
Dimethylsulfoxid

Vand

Af kvalitet til injektionsvæske

KVALITETSSIKRING

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

Hvert parti Vit Kit-Freeze undergår følgende test:

Opløsninger og CryoTips.

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.

NOVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (katalognr. 40709) eller HSV Straw (katalognr. 25246-25251) eller Cryolock™ (katalognr. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC konnektor (katalognr. 40736) eller anden adapter
- Sterile petriskåle (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller tilsvarende)
- Kryorør (4,5 ml) eller bægre og kryoholdere
- Modified HTF - HEPES (katalognr. 90126) dyrkningsmedium suppleret med protein
- Hyaluronidase (katalognr. 90101)
- Engangshandsker
- Hamilton GASTIGHT® sprøjte (50 µl, katalognr. 80901) eller andet aspirationsredskab
- Transferpipetter (glaspipetter eller mikropipettespidser med en indvendig diameter i spidsen på ~200 µm)
- Pincet eller tang
- Varmeforsegl
- SYMS-forsegler til HSV Straw
- 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)

BRUGSANVISNING

Vit Kit-Freeze krav til komponenter (pr. applikation)

- Equilibration Solution (ES):
60 µl til protokol for vitrificering af oocytter
eller
50 µl til protokol for vitrificering af embryoner
- Vitrification Solution (VS):
50 µl til vitrificeringsprotokol
- 1 CryoTip eller HSV Straw eller Cryolock (opbevarer op til 2 prøver)
- 1 konnektor

VITRIFICERINGSPROTOKOL:

BEMÆRK: Procedurene skal udføres ved stuetemperatur (20-27 °C). BRUG IKKE et mikroskop med opvarmet objektbord til følgende procedurer. FORSIGTIG: Minimer prøvernes udsættelse for lys under ækvilibrering i ES- og VS-opløsninger.

1. Bring den mængde ES og VS, der skal anvendes, til stuetemperatur (20-27 °C). **BEMÆRK:** Undgå at bringe hele hætteglassene med ES og VS 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. Modified HTF (HEPES) med protein er også påkrævet til protokollen for vitrificering af oocytter.
2. Fyld beholderen til flydende nitrogen med flydende nitrogen (tilstrækkeligt til at opnå en dybde på 4 tommer (10 cm) eller til fuldstændigt at nedsænke kryorøret på holderen), og sæt den tæt på mikroskopet. Sæt et kryorør eller bæger (uden låg) fast i den nederste klemme på en kryoholder, og nedsänk den i det flydende nitrogen som forberedelse til opbevaring af de vitrificerede prøver.
3. Bestem antallet af prøver, der skal vitrificeres.
4. Sæt en etiket med de nødvendige oplysninger på hver steril petriskål (eller låg) og hver kryoopbevaringsbeholder.
5. Vend forsigtigt hvert hætteglas med ES og VS op og ned to gange for at blande indholdet inden brug.
6. Forbered skålen med dråber af opløsning til vitrificeringsproceduren på følgende måde:

A. Protokol for vitrificering af OOCYTTER (MII):

BEMÆRK 1: Udtagne oocytter skal denuderes med hyaluronidase for at bekræfte, at de er MII.

BEMÆRK 2: Se afsnit B for protokol for vitrificering af embryoner.

1. Dispenser aseptisk en 20 µl dråbe dyrkningsmedium, Modifies HTF - HEPES med protein og ES tæt sammen på et omvendt låg af en steril petriskål som vist i figur 1, og placer skålen på mikroskopets objektbord:
 - en 20 µl dråbe Modified HTF (HEPES med protein)
 - tre 20 µl dråber (60 µl i alt) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Fjern dyrkningsskålen med MII-oocytterne fra inkubatoren, og kontroller prøvernes kvalitet under mikroskop. Når det er muligt, vælges kun oocyt(ter) af den bedste kvalitet på MII-stadiet.
FORSIGTIG: Minimer prøvens/prøvernes udsættelse for lys under ækvilibrering i H-, ES- og VS-dråberne.
3. Overfør oocytten (op til 2 ad gangen) med en minimal volumen af mediet fra dyrknings-skålen (i inkubatoren) ind i 20 µl-dråben af H i ét minut.
4. Lad H-dråben flyde sammen med ES1 (se figur 1, pil 1) vha. spidsen på transferpipetten, og tillad spontan blanding af de to opløsninger i 2 minutter.
5. Bland derefter dråben af ES2 (pil 2) med de tidligere blandede dråber, og lad den stå i 2 minutter.
6. Overfør oocytten/oocytterne med minimal volumen af opløsningen fra den sammenflydte ES3-dråbe i 6-10 minutter.
Bemærk: Ækvilibrering af oocyt(ter) i ES3 er færdig, når tykkelsen på zona pellucida og det perivitelline rum er den samme. Oocytten/oocytterne vil bundfælde sig i bunden af dråben inden for 3 minutter.
7. Under ækvilibreringstiden i ES3:
Dispenser aseptisk en (1) 50 µl dråbe af VS 2 minutter før ækvilibreringens afslutning, og klargør CryoTip (fig. 3), HSV Straw (fig. 4) eller Cryolock (fig. 5) til påfyldning:
BEMÆRK: Undersøg omhyggeligt vitrificeringsproduktet og spidsen, inden proceduren startes
 - CryoTip: Tilslut til Hamilton-sprøjten eller et passende aspirationsredskab ved hjælp af en konnektor eller adapter for at sikre en tæt forsegling. **BEMÆRK:** Behold beskyttelsesmanchetten af metal over den tynde, skrøbelige ende af spidsen for at beskytte den, indtil prøverne er klar til at blive påfyldt.
 - HSV Straw: Forbind den lange ende af den blå plastindføringsenhed til den farvede ende af håndteringsstaven.
 - Cryolock: Tag låget af.
8. Følgende trin (9-13) skal udføres på 80-110 sekunder. FORSIGTIG: Eksponering af prøver for VS skal begrænses for at forhindre cytotoxicitet. Prøven/prøverne har tendens til at flyde i VS. Derfor skal fokus justeres på mikroskopet for at vedligeholde kontinuerlig visualisering under eksponering. Hold spidsen af transferpipetten tæt på for at sikre hurtigt overførsel mellem VS-dråberne. Se figur 6.
9. Når ækvilibrering i ES er færdig, trækkes noget ES op i transferpipetten. Overfør prøven/prøverne med minimal volumen fra dråben af ES til dråben af VS i 30 sekunder.
10. Indsæt og varmeførsegl CryoTip på følgende måde (se figur 7a):
 - Træk beskyttelsesmanchetten af metal op langs CryoTip for at eksponere den tynde, skrøbelige ende af spidsen.
 - Håndter CryoTip og Hamilton-sprøjten under mikroskopisk observation, og aspirer forsigtigt en lille volumen VS til mærke nr. 1 på CryoTip.
 - Fortsæt observation under mikroskopet, og aspirer forsigtigt prøven med VS til mærke nr. 2 på CryoTip.
 - Observer nu CryoTip direkte, og aspirer mere VS til mærke nr. 3.

- Prøven skal være påfyldt til mellem mærke nr. 2 og nr. 3.
- Varmeforsegl (forsegling nr. 1) CryoTip på (eller lige under) mærke nr. 1, og træk beskyttelsesmanchetten ned igen for at beskytte den tynde, skrøbelige spids.
- Fjern forsigtigt CryoTip fra aspirationsredskabet og adapteren og varmforsægl derefter (forsegling nr. 2) i den tykke ende af CryoTip over mærke nr. 4.
- Nedsenk den lukkede CryoTip direkte i flydende nitrogen (kølingshastighed på $-12.000^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) (se figur 7b).

Indsæt og forsegl HSV Straw på følgende måde:

- Brug en mikropipette til omhyggeligt at deponere prøven/prøverne i rillen på kapillarrøret 1 mm fra enden. Dråben, der holder prøven/prøverne skal være under 0,5 μl . Maksimalt 2 oocytter eller embryoner for hvert kapillarrør.
- Placer øjeblikkeligt kapillarrøret og indføringsenheden i strået, og skub, indtil den firkantede del af indføringsenheden kommer i kontakt med den kegleformede ende på strået.
- Klem strået let mellem tommel- og pegefingern, og fjern indføringsenheden.
- Mens strået stadig holdes på plads, forsegl den åbne ende med en SYMS-forsegler.
- Hold strået ved hjælp af en pincet i håndteringsstavens område.
- Nedsenk hurtigt hele strået lodret i LN_2 . Rør forsigtigt strået rundt i LN_2 i et par sekunder for at undgå dannelse af et isolerende lag af luftbobler omkring strået.

Påfyld Cryolock på følgende måde:

- Brug en mikropipette til forsigtigt at påfylde højst 2 prøver på den konkave overflade af spidsen (samme side af Cryolock-logoet) omkring 3 mm (1/8 tomme) fra kanten af spidsen (brug sort mærke som reference), og fjern al overskydende kryoprotektantopløsning for at efterlade så lidt vitrificerende medium som muligt ($\leq 1 \mu\text{l}$).
 - Mulighed A: Før øjeblikkeligt, og inden Cryolock nedsænkes i LN_2 , spidsen forsigtigt ind i låget, som drejes tæt til, indtil det sidder godt fast.
 - Mulighed B: Nedsenk omgående spidsen og låget i LN_2 . Vent til det holder op med at boble for at tillade ækvilibrering. Indfør forsigtigt spidsen i låget, og drej til det er lukket tæt til.
- BEMÆRK: Mulighed B er ikke godkendt til brug i USA.
- Nedsenk hurtigt Cryolock i flydende nitrogen.

BEMÆRK: Opbevar altid Cryolock med låget vendende nedad.

11. Placer den vitrificerede CryoTip, HSV Straw eller Cryolock i det nedsunkede kryorør eller bæger fyldt med LN_2 (på kryoholderen). Sæt låg på kryorør (eller bægeret), eller sæt det omvendt sammen med et andet kryorør uden låg for at sikre det vitrificerede produkt i flydende nitrogen.
12. Flyt beholderen med LN_2 tæt på LN_2 -kryofryseren, og overfør kryoholderen med dens indhold til kryofryseren med henblik på langtidsopbevaring.

B. EMBRYONER (PN til blastocyster):

Vitrificeringsprotokol:

1. Dispenser aseptisk en 50 μl dråbe ES på et omvendt låg til en petriskål.
2. Fjern dyrkningsskålen med embryon(er) fra inkubatoren, og kontroller prøvens/prøvernes kvalitet under mikroskop. Når det er muligt, vælges kun embryon(er) af den bedste kvalitet til vitrificering.
3. Overfør forsigtigt prøven (op til to ad gangen) med en minimal volumen af mediet fra dyrkningsskålen til ES-dråben, og start timeren.
Embryoner skal ækvilibreres langsomt ved frit fald i ES-dråben i 6-10 minutter.
Bemærk: Prøven vil skrumpes og derefter gradvist vende tilbage til sin oprindelige størrelse, hvilket angiver, at ækvilibrering er fuldført.
FORSIGTIG: Minimer prøvens/prøvernes udsættelse for lys under ækvilibrering i ES- og VS-dråberne.
4. I løbet af denne ækvilibreringstid i ES:
 - Klargør en 50 μl dråbe VS-opløsning som vist på fig. 8, og gør CryoTip, HSV Straw eller Cryolock klar til påfyldning.

Følg protokollen ovenfor (Afsnit A - Protokol for vitrificering af OOCYTER (MI)) fra trin 9 til 12 for eksponering for VS-opløsninger, påfyldning af CryoTip, HSV Straw eller Cryolock, nedsænkning i LN_2 og langtidsopbevaring.

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 $-2-8^{\circ}\text{C}$. Når Vitrification Freeze 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.

Som en ekstra forholdsregel under forberedelsen tilrådes det, at hver Cryotip undersøges nøje, når den tages ud af emballagen. Inden brug skal CryoTups undersøges under passende forstørrelse (40x) for mulig beskadigelse (såsom brud på eller revner i spidserne), som kan være opstået under transport.

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 reproduktionsmiddelprodukter 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. Håndter 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 ammattikäyttöön.

KÄYTTÖAIHEET

Vit Kit-Freeze on tarkoitettu käytettäväksi avusteisissa lisääntymismenetelmissä ihmisen oosyyttien (MI), pronukleaaristen (PN) tsygoottien (päivän 3 jakautumisvaiheen alkioihin asti) ja blastokystavaiheen alkoiden vitrifikaatioon ja säilytykseen. Tämä sarja on suunniteltu käyttööseen CryoTip (tuotenro 40709) ja Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) -tuotteiden kanssa näytteiden optimaalista topumista varten.

LAITTEEN KUVAUUS

Equilibration Solution-ES on HEPES-puskuroitu Medium-199-elatusaine, joka sisältää gentamysiinisulfaattia, 7,5 % (tilavuus/tilavuus) sekä DMSO:ta että eteeniglykolia ja 20 % (tilavuus/tilavuus) Dextran Serum Supplement (DSS) -liuosta.

Vitrification Solution-VS on HEPES-puskuroitu Medium-199-elatusaine, joka sisältää gentamysiinisulfaattia, 15 % (tilavuus/tilavuus) sekä DMSO:ta että eteeniglykolia, 20 % (tilavuus/tilavuus) DSS-liuosta ja 0,5 M sakkaroosia.

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

Näitä kahta liuosta käytetään peräkkäin asteittaisen mikropisaravitrifikaatiomenetelmän mukaan.

KOOSTUMUS

Suolat ja ionit

natriumkloridi
natriumfosfaatti
kaliumkloridi
magnesiumsulfaatti
natriumasettaatti
kalsiumkloridi
koliinikloridi
rautanitraatti

Puskuri

natriumbikarbonaatti
HEPES

pH-indikaattori

fenolipuna

Aminohapot

arginiini
glysiini
histidiini
lysiini

proliini

tyrosiini
alaniini
asparagiinihappo
glutamiinihappo
isoleusiini
leusiini
metioniini
fenyylialaniini
seriini

treoniini

tryptofaani
valiini
hydroksiprolini
kystiini
kysteiini

Antioksidantti

glutationi

Muut

adeniinisulfaatti
deoksiriboosi
riboosi
guaniini
urasili
ksantiini
tymiini
hypoksantiini
adenosiini

Vitamiinit ja mineraalit

kalsiferoli
askorbiinihappo
aminobentsiinihappo
nikotiinihappo
nikotiinihappoamidi
pantoteenihihappo
riboflaviini
tiamiini
biotiini

pyridoksiini

natriumbisulfiitti
foolihappo
alfatokoferoli

Antibiootit

gentamysiinisulfaatti

Energiasubstraattit

glukoosi
inositoli

Proteiini

ihmisen seerumialbumiini

Kryoprotektantti

dekstraani
sakkaroosi
eteeniglykoli
dimetyylisulfoksidi

Vesi

injektionesteisiin tarkoitettun veden laatuinen

LAADUNVARMENNUS

Vit Kit-Freeze -pakkauksen liuokset ovat kalvosuodatettuja ja validoitujen valmistusmenetelmien mukaisesti aseptisesti käsiteltyjä. Jokaiselle Vit Kit-Freeze -erälle tehdään seuraavat testit:

Liuokset ja CryoTip-kapillaaripillit

- 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.

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (tuotenro 40709) tai HSV Straw (tuotenro 25246-25251) tai Cryolock™ (tuotenro CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Connector (tuotenro 40736) -liitin tai muu sovitin
- Sterililejyä petrimaljoja (50 X 9 mm, Falcon 351006 tai vastaava)
- Kryoputkia (4,5 ml) tai kryoputkiastioita ja kryoputkipidikkeitä
- Modified HTF - HEPES (tuotenro 90126) -elatusaine, proteiinilla täydennetty
- Hyaluronidaasi (tuotenro 90101)
- Kertakäyttökäsineitä
- Hamilton GASTIGHT® -ruisku (50 µl, tuotenro 80901) tai muu aspirointivaline
- Siirtopipettejä (vedettyjä lasipipettejä tai mikropipettikärkiä, joiden kärjen sisäläpimitta on noin 200 µm)
- Pinsetit tai atulut
- Impulssikuumaumaaja
- SYMS-saumaaja HSV Straw -kapillaaripilleille

- Sekuntikello tai ajastin
- Nestetyyppisäiliö (Dewar-astia tai kannellinen styroksiaastia, tilavuus 1–2 l)
- Nestettyä (riittävä määrä 4 tuuman [10 cm:n] syvyyden saavuttamiseksi säiliössä)

KÄYTTÖOHJEET

Tarvittavat Vit Kit-Freeze -ainesosat (käyttökertaa kohden):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl oosyyttien vitrifikaatiomenetelmää varten
tai
50 µl alkiodien vitrifikaatiomenetelmää varten
- Vitrication Solution (VS):
50 µl vitrifikaatiomenetelmää varten
- 1 CryoTip tai HSV Straw tai Cryolock (enintään 2 näytteen säilytys)
- 1 liitin

VITRIFIKAATIOMENETELMÄ:

HUOMAUTUS: Toimenpiteet on tehtävä huoneenlämmössä (20–27 °C). Seuraaviin toimenpiteisiin EI SAA käyttää kuumentettua mikroskooppialustaa. **VAROITUS:** Minimoi näytteen altistuminen valolle ES- ja VS-liuoksissa tasapainottumisen aikana.

1. Saata käytettävä määrä ES- ja VS-liuoksia huoneenlämpöiseksi (20–27 °C). **HUOMAUTUS:** Vältä koko ES- ja VS-pullojen saattamista huoneenlämpöisiksi toistuvasti, silloin kun käyttökerralla tarvitaan vain osa liuoksesta. On parempi ottaa yksi erä, joka käytetään, ja palauttaa pullo 2–8 °C:n lämpötilaan heti erän ottamisen jälkeen. Modified HTF (HEPES) -liuosta, joka sisältää proteiinia, tarvitaan myös oosyyttien vitrifikaatiomenetelmää varten.
2. Täytä nestetyyppisäiliö nestetyellä (riittävä määrä, jotta saadaan 4 tuuman [10 cm:n] syvyys tai jotta kryoputkipidikkeessä oleva kryoputki voidaan upottaa kokonaan) ja aseta säiliö mikroskoopin lähelle. Kiinnitä kryoputki tai kryoputkiastia (korkki avattuna) kryoputkipidikkeen pohjaklipsiin ja upota nestetyyppeen valmisteluna vitrifioitujen näytteiden säilyttämistä varten.
3. Määritä vitrifioitavien näytteiden määrä.
4. Merkitse jokainen petrimalja (tai kansi) sekä kryosäiliöväline tarvittavilla tiedoilla.
5. Käännä varovasti kutakin ES- ja VS-pulloa kaksi kertaa sisällön sekoittamiseksi ennen käyttöä.
6. Valmistele malja, jossa on vitrifiointitoimenpiteen nestepisarat:

A. OOSYYTTIEN (MII) vitrifikaatiomenetelmä:

HUOMAUTUS 1: Kerätyt oosyytit paljastetaan hyaluronidaasilla, jotta voidaan varmistaa, ovatko ne MII-vaiheessa.

HUOMAUTUS 2: Katso alkiodien vitrifikaatiomenetelmä osiosta B.

1. Jaa aseptisesti 20 µl:n pisara elatusainetta, Modified HTF - HEPES -liuosta (jossa on proteiinia) ja ES-liuosta lähelle toisiaan steriiliin petrimaljan käännetylle kannelle, kuten kuvassa 1, ja aseta kansi mikroskooppialustalle:
 - yksi 20 µl:n pisara Modified HTF -liuosta (HEPES, johon on lisätty proteiinia)
 - kolme 20 µl:n pisaraa (yhteensä 60 µl) ES-liuoksia (ES1, ES2, ES3).
2. Poista MII-oosyyttejä sisältävä viljelymalja lämpökaapista ja tarkista näytteiden laatu mikroskoopin avulla. Jos mahdollista, valitse vain parhaan laadun MII-vaiheen oosyytti (tai oosyyttejä).
VAROITUS: Minimoi näytteiden altistuminen valolle H-, ES- ja VS-pisaroissa tasapainottumisen aikana.
3. Siirrä oosyytti (enintään 2 kerrallaan) ja minimimäärä elatusainetta viljelymaljalta (lämpökaapissa) 20 µl:n H-pisaraan yhden minuutin ajaksi.
4. Yhdistä H-pisara ES1-pisaraan (ks. kuva 1, nuoli 1) siirtopipetin kärjen avulla. Anna näiden kahden liuoksen sekoittua spontaanisti 2 minuutin ajan.
5. Yhdistä sitten ES2-pisara (nuoli 2) aiemmin yhdistettyihin pisaroihin. Anna seistä 2 minuutin ajan.
6. Siirrä oosyytti (tai oosyytit) ja minimimäärä liuosta yhdistetystä pisarasta ES3-pisaraan 6–10 minuutin ajaksi. **Huomautus:** oosyyttien tasapainottuminen ES3:een on valmis, kun munasolun keton paksuus ja ruskuaista ympäröivä tila ovat yhtä suuria. Oosyytit asettuvat pisaran pohjalle 3 minuutin kuluessa.
7. Tasapainottumisen aikana ES3:ssa:
Jaa aseptisesti yksi (1) 50 µl:n pisara VS-liuosta 2 minuuttia ennen tasapainottumisen valmistumista ja valmistele CryoTip (kuva 3), HSV Straw (kuva 4) tai Cryolock (kuva 5) latausta varten:
HUOMAUTUS: Tarkasta huolellisesti vitrifikaatiolaitte ja kärki ennen toimenpiteen aloittamista.
 - CryoTip: liitä Hamilton-ruiskuun tai asianmukaiseen aspirointivälineeseen käyttämällä liitintä tai sovitinta, jolla saadaan aikaan tiivis liitäntä. **HUOMAUTUS:** Pidä metallinen suojaholkki vedetyn hienorakenteisen kärjen päällä sen suojaamiseksi, kunnes olet valmis lataamaan näytteet.
 - HSV Straw: liitä sinisen muovisen asettimen pidempi pää käsittelysauvan värilliseen päähän.
 - Cryolock: irrota tulppa.
8. Seuraavat vaiheet (9–13) on saatava valmiiksi 80–110 sekunnin kuluessa. **VAROITUS:** Näytteiden altistumista VS-liuokselle on rajoitettava sytotoksisuuden estämiseksi. Näytteillä on taipumus kellua VS-liuoksessa, joten säädä mikroskoopin fokus niin, että säilytät jatkuvan näkökentän altistumisen aikana. Pidä siirtopipetti lähellä, jotta voit varmistaa nopean siirtämisen VS-pisaroiden välillä. Katso kuva 6.
9. Kun tasapaino ES-liuoksessa on saavutettu, vedä hieman ES-liuosta siirtopipettiin ja siirrä näytteet mahdollisimman pienessä määrässä ES-pisarasta VS-pisaraan 30 sekunnin ajaksi.

10. Lataa ja kuumasaumaa CryoTip seuraavasti (ks. kuva 7a):
 - Vedä metallinen suojaholkki ylös CryoTip-kapillaaripillillä pitkin niin, että ohut hauras kärjen pää tulee näkyviin.
 - Aspiroi varovasti pieni määrä VS-liuosta CryoTipin merkkiin 1 asti käsittelemällä CryoTip-kapillaaripillillä ja Hamilton-ruiskua mikroskoopin alla.
 - Jatka tarkkailua mikroskoopilla ja aspiroi näyte varovasti VS-liuoksen kanssa CryoTipin merkkiin 2.
 - Tarkkaile nyt CryoTip-kapillaaripillillä suoraan ja aspiroi lisää VS-liuosta merkkiin 3 asti.
 - Näytteen täytyy sijaita merkin 2 ja merkin 3 välissä.
 - Kuumasaumaa (saumaus 1) CryoTip merkin 1 kohdalta (tai juuri sen alapuolelta) ja työnnä suojaholkki takaisin alas niin, että se peittää ja suojaa ohuen hauraan kärjen.
 - Poista CryoTip varovasti aspirointivälineestä ja sovitimesta ja kuumasaumaa (saumaus 2) sitten CryoTip-kapillaaripillin paksun pään kohdalta merkin 4 yläpuolelta.
 - Upota peitetty CryoTip suoraan nestetytpeen (jäähdytysnopeus 12 000 °C/min) (ks. kuva 7b).
- Lataa ja saumaa HSV Straw seuraavasti:
 - Aseta näytteet varovasti mikropipetillä kapillaaritangon uraan 1 mm:n etäisyydelle kärjestä. Näytteet sisältävän pisanan on oltava tilavuudeltaan alle 0,5 µl. Enintään 2 oosyyttiä tai alkioita kutakin kapillaaritankoa kohden.
 - Aseta kapillaaritanko ja manipuloija välittömästi kapillaaripilliin ja työnnä, kunnes manipuloijan suorakaiteen muotoinen osa koskettaa pillin laajenevaa päätä.
 - Purista kapillaaripillillä kevyesti peukalon ja etusormen välissä ja irrota asetin.
 - Pidä kapillaaripillillä edelleen paikoillaan ja saumaa avonainen pää SYMS-saumaajalla.
 - Pitele kapillaaripillillä pinseteillä käsittelysauvan kohdalta.
 - Työnnä koko kapillaaripilli nopeasti pystyasennossa nestetytpeen. Sekoita kapillaaripillillä varovasti nestetytpeessä muutaman sekunnin ajan, jotta pillin ympärille ei muodostuisi eristävää ilmakuplakerrosta.
- Lataa Cryolock seuraavasti:
 - Käytä mikropipettiä ja lataa varovasti enintään 2 näytettä kärjen koveralle pinnalle (samalle puolelle kuin Cryolock-logo) noin 3 mm (1/8") kärjen reunasta (käytä mustaa merkkiä viitteenä). Poista mahdollinen ylimääräinen kryoprotektanttiliuos ja jätä mahdollisimman vähän vitrifikaatiolatusainetta ($\leq 1 \mu\text{l}$).
 - Vaihtoehto A: Työnnä kärki huolellisesti korkkiin ja käännä tiukasti kiinni. Tee tämä heti ja ennen Cryolock-laitteen upottamista nestetytpeen.
 - Vaihtoehto B: Upota kärki ja korkki heti nestetytpeen. Anna tasapainottua odottamalla, että kupliminen loppuu. Työnnä kärki varovasti korkkiin ja käännä tiukasti kiinni.
- HUOMAUTUS: Vaihdoetta B ei ole hyväksytty käytettäväksi Yhdysvalloissa.
- Upota Cryolock nopeasti nestetytpeen.
- HUOMAUTUS: Säilytä Cryolock-laitetta aina korkki alaspäin.

B. ALKIOT (prenukleaarista blastokystaan):

- Vitrifikaatiomenetelmä:
1. Jaa aseptisesti yksi 50 µl:n pisara ES-liuosta petrimaljan käännettyyn kanteen.
 2. Poista alkion tai alkiota sisältävä viljelymalja lämpökaapista ja tarkista näytteen laatu mikroskoopin avulla. Jos mahdollista, valitse vain parhaan laadun alkiot (alkioita) vitrifikaatioon.
 3. Siirrä varovasti näyte (enintään kaksi kerrallaan) ja minimilavuus elatusainetta viljelymaljalta ES-pisaraan ja käynnistä ajastin.
- Alkioiden pitäisi tasapainottua ES-pisaraan hitaasti ja vapaasti pudoten 6–10 minuutin ajan.
- Huomautus: Näyte kutistuu ja palaa sitten asteittain alkuperäiseen kokoonsa, mikä osoittaa, että tasapainottuminen on valmis.
- VAROITUS: Minimoi näytteen (tai näytteiden) altistuminen valolle ES- ja VS-pisaroissa tasapainottumisen aikana.
4. Tasapainottumisen aikana ES-liuoksessa:
 - Jaa yksi 50 µl:n pisara VS-liuosta kuvan 8 mukaisesti ja valmistelee CryoTip, HSV Straw tai Cryolock latausta varten.
- Noudata yllä esitetyn menetelmän (Osa A – Oosyyttien [MI] vitrifikaatiomenetelmä) vaiheita 9–12, jotka koskevat VS-liuoksille altistumista, CryoTip-kapillaaripillin, HSV Straw -kapillaaripillin tai Cryolock-laitteen lataamista, upotusta nestetytpeen ja pitkäaikaista säilytystä.

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

SÄILYTYSOHJEET JA STABILIUUS

Säilytä avaamattomat pullot jääkaapissa 2–8 °C:ssa. Kun Vitrification Freeze 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.

Suosittelemme lisävaroitteiksi valmistustoimenpiteen aikana, että jokainen CryoTip tarkastetaan huolellisesti, kun se otetaan pakkauksesta. CryoTip-kapillaaripillit on tutkittava ennen käyttöä sopivalla suurennuksella (40-kertainen suurennus) mahdollisten kuljetuksen aikana tapahtuneiden vaurioiden (kuten kärjen rikkoutumien tai murtumien) varalta.

Älä käytä mitään liuospulloa, jos siinä on vaurion tai vuodon merkkejä tai jos liuoksessa näkyy hiukkasia, se on sameaa 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 inaktivointia 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 patogeenejä. 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 lisensioimilla 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 INDIKĀCIJAS

Vit Kit-Freeze ir paredzēts lietošanai ar palīg līdzekļiem veicamās reproduktīvās procedūrās cilvēka ovocītu (MI), pronukleāru (PN) zigotu līdz embriju 3. dalīšanas dienai, kā arī blastocistu stadijas embriju vitrifikācijai un glabāšanai. Šis komplekts paredzēts lietošanai kopā ar CryoTip (kataloga nr. 40709) un vitrifikācijas komplektu atkausēšanai (Vit Kit-Thaw) paraugu optimālai reģenerācijai.

IERĪCES APRAKSTS

Līdzsvarošanas šķīdums (Equilibration Solution-ES) ir HEPES buferšķīdums barotnei-199, kas satur gentamicīna sulfātu, 7,5% (tilp./tilp.) DMSO un tikpat etilēnglikola, kā arī 20% (tilp./tilp.) dekstrāna seruma papildinājuma (DSS).

Vitrifikācijas šķīdums (Vitrification Solution-VS) ir HEPES buferšķīdums barotnei-199, kas satur gentamicīna sulfātu, 15% (tilp./tilp.) DMSO un tikpat etilēnglikola, kā arī 20% (tilp./tilp.) DSS un 0,5 M saharozes.

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

Šie abi šķīdumi ir jālieto secīgi saskaņā ar pakāpenisko mikropilenu vitrifikācijas protokolu.

SASTĀVS

Sāļi un joni

Nātrija hlorīds
Nātrija fosfāts
Kālija hlorīds
Magnija sulfāts
Nātrija acetāts
Kalcija hlorīds
Holīna hlorīds
Dzelzs nitrāts

Prolīns

Tirozīns

Alanīns

Asparagīnskābe

Glutamīnskābe

Izoleicīns

Leicīns

Metionīns

Fenilalanīns

Serīns

Treonīns

Triptofāns

Valīns

Hidroksiprolīns

Cistīns

Cisteīns

Antioksidanti

Glutations

Citas

Adenīna sulfāts

Dezoksiriboze

Riboze

Guanīns

Uracils

Ksantīns

Timīns

Hipoksantīns

Adenoīns

Vitamīni un minerālvielas

Kalciferols

Askorbīnskābe

Aminobenzoskābe

Nikotīnskābe

Nikotīnskābes amīds

Pantotēnskābe

Riboflavīns

Tiamīns

Biotīns

Piridoksīns

Nātrija bisulfīts

Folskābe

Alfa-tokoferols

Antibiotikas

Gentamicīna sulfāts

Enerģijas avoti

Glikoze

Inozitols

Proteīni

Cilvēka seruma albumīns

Krioprotektanti

Dekstrāns

Saharoze

Etilēnglikols

Dimetilsulfoksīds

Ūdens

Injekciju ūdens (WFI)

kvalitāte

KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

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

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

šķīdumiem un CryoTips.

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

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

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

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

NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NETIEK IEKĻAUTI

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (kataloga nr. 40709) vai HSV salmiņš (kataloga nr. 25246-25251), vai Cryolock™ (kataloga nr. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC savienotājs (kataloga nr. 40736) vai cits adaptors
- Sterili Petri traučiņi (50 X 9 mm, Falcon 351006 vai līdzvērtīgi)
- Kriostobrīņi (4,5 ml) vai kausiņi un krioturētāji
- Modificēta HTF - HEPES (kataloga nr. 90126) kultūras barotne, bagātināta ar proteīniem
- Hialuronidāze (kataloga nr. 90101)
- Vienreizlietojami cimdi
- Hamilton GASTIGHT® šļirce (50 μ l, kataloga nr. 80901) vai cits atsūkšanas rīks
- Pipetes pārnesei (uzmaucamas stikla pipetes vai mikropipešu uzgaļi ar uzgaļa iekšējo diametru ~ 200 μ m)
- Pincetes vai knaiblītes
- Pret pulsveida karsēšanu droša plomba
- SYMS plomba HSV salmiņam
- Hronometrs vai taimeris
- Šķidrā slāpekļa rezervuārs (Djuāra vai putuplasta trauks ar vāku, tilpums 1–2 l)
- Šķidrās slāpekli (pieņemami daudz 4 collu (10 cm) biezas slānim rezervuārā)

LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

Nosacījumi Vit Kit-Freeze komponentiem (atbilstoši lietošanas veidam):

- Līdzsvarošanas šķīdums (ES):
60 µl ovocītu vitrifikācijas protokolam
vai
50 µl embriju vitrifikācijas protokolam
- Vitrifikācijas šķīdums (VS):
50 µl vitrifikācijas protokolam
- 1 CryoTip vai HSV salmiņš, vai Cryolock (glabā līdz 2 paraugiem)
- 1 savienotājs

VITRIFIKĀCIJAS PROTOKOLS:

PIEZĪME: procedūras ir jāveic istabas temperatūrā (20–27 °C). Tālāk minētajām procedūrām NEIZMANTOJIET sakarsētu mikroskopa platformu. UZMANĪBU! Parauga līdzsvarošanas ES un VS šķīdumos laikā maksimāli samaziniet gaismas iedarbību.

1. Izmantojamo ES un VS daudzumu sasildiet līdz istabas temperatūrai (20–27 °C). **PIEZĪME.** Ja katru reizi nepieciešama tikai daļa ES un VS flakona, visu flakonu nedrīkst atkārtoti sasildīt līdz istabas temperatūrai. Labāk sadalīt lietošanai paredzēto daudzumu vienādās daļās un flakonus novietot atpakaļ 2–8 °C uzreiz pēc sadalīšanas. Ovocītu vitrifikācijas protokolam vajag arī modificēto HTF (HEPES) ar proteīniem.
2. Šķidrā slāpekļa rezervuāru uzpildiet ar šķidro slāpekli (tik, cik pietiek 4 collas (10 cm) biežam slānim, vai tik, lai pilnībā iegremdētu kriostobriņu uz turētāja) un novietojiet blakus mikroskopam. Kriostobriņu vai kausiņu (neapvākotu) piestipriniet pie krioturētāja apakšējās skavas un iegremdējiet šķidrajā slāpekļī, sagatavojot vitrificējamo paraugu glabāšanai.
3. Nosakiet vitrificējamo paraugu skaitu.
4. Katru sterilo Petri trauciņu (vai vāciņu) un kriozglabāšanas ierīci marķējiet ar nepieciešamo informāciju.
5. Pirms lietošanas saudzīgi divreiz apvēršiet ES un VS flakonus, lai samaisītu saturu.
6. Sagatavojiet trauciņu ar šķīdumu pilnienam vitrificācijas procedūrai, rīkojoties turpmāk minētajā veidā.

A. OVOCĪTU (MII) vitrificācijas protokols

1. PIEZĪME: iegūtie ovocīti tiek atfīrēti ar hialuronidāzi, lai apstiprinātu, ka tie ir MII.

2. PIEZĪME: embriju vitrificācijas protokolu skatīt B sadaļā.

1. Aseptiskā veidā uz otrādi apgriezta sterila Petri trauciņa vāciņa pa 20 µl pilienam kultūras barotnes, modificētās HTF (HEPES) ar proteīniem, kā arī ES uzpildiniet tuvu vienu otram, kā parādīts 1. attēlā, un trauciņu novietojiet uz mikroskopa platformas:
 - viens 20 µl pilienam modificētās HTF (HEPES ar proteīniem)
 - trīs 20 µl pilieni (kopā 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Izņemiet kultūras trauciņu ar MII ovocītiem no inkubatora un mikroskopā pārbaudiet paraugu(-u) kvalitāti. Ja iespējams, izvēlieties tikai vislabākās kvalitātes MII stadijas ovocītus.
UZMANĪBU! Veicot līdzsvarošanu H, ES un VS pilienos, maksimāli samaziniet gaismas iedarbību uz paraugu(-iem).
3. Ovocītu (līdz 2 vienlaicīgi) ar minimālu barotnes daudzumu no kultūras trauciņa (inkubatorā) uz vienu minūti pārnēsiet H 20 µl pilienā.
4. Izmantojot pārnešanai paredzētās pipetes uzgali, H pilienus sapludiniet ar ES1 (skatīt 1. attēla 1. bultuņu) un ļaujiet 2 minūtes notikt abu šķīdumu spontānai saplūšanai.
5. Tad ES2 (2. bultuņa) sapludiniet ar iepriekš sapludinātajiem pilieniem un atstājiet uz 2 minūtēm.
6. Ovocītu(-s) minimālajā šķīduma daudzumā uz 6–10 minūtēm pārnēsiet no sapludinātā šķīduma pilienus uz ES3 pilienus. **Piezīme:** ovocīta(-u) līdzsvarošana ES3 ir pabeigta, kad olšūnas caurspīdīgais apvalks (*zona pellucida*) un perivitelinās telpas biežums ir vienāds. Ovocīts(-i) pilienā nogulsnesies 3 minūšu laikā.
7. Veicot līdzsvarošanu ES3 šķīdumā:
2 minūtes pirms līdzsvarošanas pabeigšanas iepilniet vienu (1) 50 µl VS pilienus un sagatavojiet CryoTip (3. att.), HSV salmiņu (4. att.) vai Cryolock (5. att.) uzpildīšanai:
PIEZĪME. Pirms procedūras sākšanas rūpīgi pārbaudiet vitrificācijas ierīci un uzgali.

- CryoTip: savienojiet ar Hamilton šļirci vai atbilstošu atsūkšanas rīku, izmantojot savienotāju vai adapteru, nodrošinot ciešu stiprību. **PIEZĪME.** Līdz paraugu ievietošanas brīdim metāla apvalka uzmavu paturiet uz smalkā stieptā uzgaļa gala, lai to aizsargātu.
 - HSV salmiņš: zilās plastmasas ievietošanas ierīces garāko galu pievienojiet darba stienīša krāsainajam galam.
 - Cryolock: noņemiet vāciņu.
8. 80–110 sekundēs jāveic tālāk norādītās darbības (9–13). **UZMANĪBU!** Lai nepieļautu citotoksicitāti, VS iedarbība uz paraugiem ir jāierobežo. Paraug(-i) mēdz peldēt VS, tāpēc pielāgojiet mikroskopa fokusus, lai iedarbības laikā saglabātu nepārtrauktu vizualizāciju, bet pārnese pipetes uzgali turiet blakus, lai ātri veiktu pārnese viena VS piliena uz otru. Skatīt 6. attēlu.
 9. Kad pabeigta līdzsvarošana ES, nedaudz ES ievieliet pārnese pipetē un paraugu(-us) ar minimālu tilpumu 30 sekundes pārvietojiet no ES piliena uz VS pilienus.
 10. Piepildiet un karstumu hermetizējiet CryoTip (skatīt 7.a attēlu):
 - metāla apvalka uzmavu bīdīet augšup pa CryoTip, lai atklātos smalkais traušlais uzgaļa gals;
 - rīkojoties ar CryoTip un Hamilton šļirci, paralēli novērojot zem mikroskopa, nelielu VS daudzumu uzmanīgi atsūciet līdz 1. atzīmei uz CryoTip;
 - turpiniet novērošanu zem mikroskopa un paraugu ar VS uzmanīgi atsūciet līdz 2. atzīmei uz CryoTip;
 - tagad novērojiet tieši CryoTip un vairākus VS atsūciet līdz 3. atzīmei;
 - paraugam jāatrodas starp 2. un 3. atzīmi;

- sildiet plombu (1. izolāciju) uz (vai tieši zem) CryoTip 1. atzīmes un vāka uzdevu pabīdīet atpakaļ uz leju, lai pārklātu un aizsargātu smalko, trauslo uzgali;
- uzmanīgi noņemiet CryoTip no atsūkšanas rīka un adaptera un tad sasildiet plombu (2. izolāciju) CryoTip biežajā galā virs 4. atzīmes;
- pārklāto CryoTip ielieciet tieši šķidrajā slāpekļī (atdzesējot ar ātrumu $-12\ 000\ ^\circ\text{C}/\text{min}$) (skatīt 7.b attēlu).

Ielieciet ar hermetizējiet HSV salmiņus:

- izmantojot mikropipeti, paraugu(-us) uzmanīgi iepilniet kapilārā stobriņā notekā 1 mm attālumā no gala. Pilienam, kas satur paraugu(-us), jābūt mazākam par 0,5 μl . Katram kapilārajam stobriņam drīkst būt ne vairāk kā 2 ovocīti vai embriji;
- kapilāro stobriņu un ievietošanas rīku nekavējoties ievietojiet salmiņā un stumiet, līdz ievietošanas rīka taisnstūrveida daļa saskaras ar salmiņa izliekto galu;
- salmiņu viegli sakniebiet starp īkšķi un pirkstu un noņemiet ievietošanas ierīci;
- salmiņu noturot vietā, hermetizējiet atvērto galu, izmantojot SYMS plombu;
- darba stienīša zonā salmiņu turiet ar pinceti;
- ātri visu salmiņu vertikāli ielieciet LN_2 . Dažas sekundes salmiņu uzmanīgi maisiet pa LN_2 , lai ap salmiņu neveidotos izolējošs gaisa burbūlu slānis.

Ielieciet Cryolock:

- izmantojot mikropipeti, ne vairāk kā 2 paraugus uzmanīgi uzlieciet uz uzgāja ieliekās virsmas (tajā pašā pusē, kur Cryolock logotips) apmēram 3 mm (1/8 collas) no uzgāja malas (atsaucei izmantojiet melno atzīmi), aizvācot krioaizsardzības līdzekļa šķidruma pārpalikumus un atstājot iespējami mazāku vitrifikācijas barotnes tilpumu ($\leq 1\ \mu\text{l}$);
- A iespēja: uzgali tūlīt un pirms Cryolock iegremdēšanas LN_2 uzmanīgi ievietojiet vāciņā, cieši pievelkot, līdz tas nostiprinās;
- B iespēja: uzgali un vāciņu nekavējoties iegremdējiet zem LN_2 . Pagaidiet, līdz beidzas burbuļošana un varētu sākties līdzsvarošana. Uzgali uzmanīgi ievietojiet vāciņā, pietiekami cieši pagriežot, līdz tas nostiprinās: PIEZĪME. B iespēja nav apstiprināta izmantošanai ASV.
- Cryolock ātri iegremdējiet šķidrajā slāpekļī.
- PIEZĪME. Cryolock vienmēr glabājiēt ar vāciņu uz leju.

11. Vitrificējamo CryoTip, HSV salmiņu vai Cryolock ievietojiet iegremdētājā ar LN_2 piepildītajā kriotobriņā vai kausiņā (uz krioturētāja). Kriotobriņam (vai kausiņam) uzlieciet vāciņu vai otrādi pievienojiet vienu kriotobriņu bez vāciņa, lai nodrošinātu, ka vitrificējamā ierīce paliek šķidrajā slāpekļī.
12. LN_2 rezervuāru pārvietojiet blakus LN_2 kriosaldētājam un krioturētāju ar saturu pārnēsiet uz kriosaldētāju ilgstošai glabāšanai.

B. EMBRIJI (no PN līdz blastocīstai)

Vitrifikācijas protokols.

1. Aseptiskā veidā vienu 50 μl pilieni ES uzpildiniet uz otrādi apgriezta Petri trauciņa vāka.
 2. Izņemiet kultūras trauciņu ar embriju(-iem) no inkubatora un mikroskopā pārbaudiet parauga(-u) kvalitāti. Ja iespējams, izvēlieties tikai vislabākās kvalitātes embriju(-s).
 3. Paraugu (ne vairāk par diviem vienlaicīgi) no kultūras trauciņa saudzīgi, kopā ar minimālu barotnes daudzumu, pārnēsiet uz ES pilieni un iedarbiniet taimerī.
- Embrijiem ES pilienā jālīdzsvarojas lēni brīvajā kritienā 6–10 minūšu laikā.
- Piezīme: paraugs saruks, bet tad pakāpeniski atgūs savu sākotnējo izmēru, kas liecinās, ka līdzsvarošana ir pabeigta.
- UZMANĪBU! Parauga(-u) līdzsvarošanas ES un VS pilienos laikā maksimāli samaziniet gaismas iedarbību.
4. Šīs līdzsvarošanas laikā ES:
 - sagatavojiet vienu 50 μl pilieni VS šķidruma, kā parādīts 8. attēlā, un sagatavojiet uzpildīšanai izvēlēto CryoTip, HSV salmiņu vai Cryolock.

Izpildiet iepriekš aprakstīto protokolu (A sadaļu – ovocītu [MII] vitrifikācijas protokolu) no 9. līdz 12. darbībai, lai uz VS iedarbotos šķidrumi, lai uzpildītu CryoTip, HSV salmiņu vai Cryolock, lai veiktu iegremdēšanu LN_2 un sagatavotu ilgtermiņa glabāšanai.

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 glabājiēt ledusskapī $-2\text{--}8\ ^\circ\text{C}$ temperatūrā. Glabājot atbilstoši norādījumiem, vitrifikācijas sasaldēšanas komplektu šķidrumi 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 palīg līdzekļiem 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.

Kā papildu piesardzības pasākumu iesakām sagatavošanās procedūras laikā rūpīgi pārbaudīt katru Cryotip, kad to izņemat no iepakojuma. Pirms lietošanas CryoTip jāpārbauda, izmantojot atbilstošu palielinājumu (40x stipruma), lai noteiktu iespējamus bojājumus (piem., gala lūzumus vai pīsumus), kas var rasties pārvadāšanas laikā.

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 pārnesšanas iespēju. Tas attiecas arī uz nezināmiem vai jaunatklātiem vīrusiem un citiem patogēniem. Nav ziņots par pierādītiem vīrusu pārnesšanas gadījumiem, lietojot albumīnu, kas izgatavots ar vispārztītiem paņēmieniem saskaņā ar Eiropas Farmakopejas specifikācijām. Lai saglabātu saikni starp pacienti un produkta sēriju, katru reizi, kad pacientei tiek ievadīti Irvine Scientific, LLC reprodūktīvajām 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 tikuši pārbaudīti arī attiecībā uz KJS.

KONTRINDIKĀCIJAS

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

WAARSCHUWING (EU): Alleen voor professioneel gebruik.

INDICATIES VOOR GEBRUIK

Vit Kit-Freeze is bestemd voor gebruik bij geassisteerde voortplantingsprocedures voor vitrificatie en bewaring van menselijke oöcyten (MI), pronucleaire (PN) zygoten, embryo's tot en met dag 3 van de splitsingsfase en embryo's in het blastocyststadium. Deze kit is bedoeld voor gebruik met de CryoTip (catalogusnr. 40709) en de Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) voor optimale terugwinning van monsters.

BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

Equilibration Solution-ES is een HEPES-gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat, 7,5% (v/v) van zowel DMSO als ethyleenglycol, en 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS) bevat.

Vitrification Solution-VS is een HEPES-gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat, 15% (v/v) van zowel DMSO als ethyleenglycol, 20% (v/v) DSS en 0,5 M sucrose 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-Freeze tot een eindconcentratie van 10 mg/ml HSA en 4 mg/ml dextran.

Deze twee oplossingen moeten achtereenvolgens gebruikt worden volgens het stapsgewijze vitrificatieprotocol met microdruppels.

SAMENSTELLING

Zouten en ionen

Natriumchloride
Natriumfosfaat
Kaliumchloride
Magnesiumsulfaat
Natriumacetaat
Calciumchloride
Cholinechloride
IJzer(III)nitraat

Buffer

Natriumbicarbonaat
HEPES

pH-indicator

Fenolrood

Aminozuren

Arginine
Glycine
Histidine
Lysine

Proline
Tyrosine
Alanine
Asparaginezuur
Glutaminezuur
Isoleucine
Leucine
Methionine
Fenylalanine
Serine
Treonine
Tryptofaan
Valine
Hydroxyproline
Cystine
Cysteïne
Antioxidant
Glutathion

Overige

Adeninesulfaat
Deoxyribose
Ribose
Guanine
Uracil
Xanthine
Thymine
Hypoxanthine
Adenosine
Vitaminen en mineralen
Calciferol
Ascorbinezuur
Aminobenzoëzuur
Nicotinezuur
Nicotinezuuramide
Pantotheenzuur
Riboflavine
Thiamine
Biotine

Pyridoxine
Natriumbisulfit
Foliumzuur
Alfatocoferol

Antibiotica

Gentamicinesulfaat

Energiesubstraten

Glucose
Inositol

Eiwit

Menselijk serumalbumine

Cryoprotectant

Dextran
Sucrose
Ethyleenglycol
Dimethylsulfoxide

Water

Farmaceutisch
kwaliteitswater (WFI)

KWALITEITSBORGING

De oplossingen in Vit Kit-Freeze zijn membraangefilterd en op aseptische wijze verwerkt volgens productieprocedures die zijn gevalideerd.

Elke partij Vit Kit-Freeze ondergaat de volgende tests:

Oplossingen en CryoTips.

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.

MATERIALEN DIE VEREIST, MAAR NIET MEEGELEVERD ZIJN

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (catalogusnr. 40709) of HSV Straw (catalogusnr. 25246-25251) of Cryolock™ (catalogusnr. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC-connector (catalogusnr. 40736) of andere adapter
- Steriele petrischalen (50 × 9 mm, Falcon 351006 of equivalent)
- Cryobuisjes (4,5 ml) of bekiers en cryohouders
- Modified HTF - HEPES (catalogusnr. 90126) kweekmedium aangevuld met eiwit
- Hyaluronidase (catalogusnr. 90101)
- Disposabele handschoenen
- Hamilton GASTIGHT®-spuit (50 µl, catalogusnr. 80901) of ander aspiratiehulpmiddel
- Transferpipetten (getrokken glazen pipetten of micropipetpunten waarbij de punt een binnendiameter heeft van ~ 200 µm)
- Pincet of forceps
- Impulse-heatsealer
- SYMS-sealapparaat voor HSV Straw

- Stopwatch of timer
- Vloeibare-stikstof tank (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)

AANWIJZINGEN VOOR GEBRUIK

Vereiste componenten voor Vit Kit-Freeze (per toepassing):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl voor het vitrificatieprotocol voor oöcyten
of
50 µl voor het vitrificatieprotocol voor embryo's
- Vitrification Solution (VS):
50 µl voor vitrificatieprotocol
- 1 CryoTip of HSV Straw of Cryolock (plaats voor maximaal 2 monsters)
- 1 connector

VITRIFICATIEPROTOCOL:

NB: Procedures moeten plaatsvinden bij kamertemperatuur (20–27 °C). Gebruik GEEN verwarmde microscooptafels voor de volgende procedures. **OPGELET:** Beperk tijdens het equilibreren in ES- en VS-oplossingen de blootstelling van monsters aan licht tot het minimum.

1. Breng de te gebruiken hoeveelheid ES en VS op kamertemperatuur (20–27 °C). **NB:** De flacons met ES en VS mogen in hun geheel niet herhaaldelijk op kamertemperatuur worden gebracht wanneer telkens slechts een deel 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. Modified HTF (HEPES) met eiwit is ook vereist voor het vitrificatieprotocol voor oöcyten.
2. Vul de vloeibare-stikstof tank met vloeibare stikstof (voldoende om een diepte van 4 inch (10 cm) te verkrijgen of om het cryobuisje op de cryohouder volledig onder te dompelen) en plaats de tank dicht bij de microscoop. Breng een cryobuisje of beker (zonder dop) in de klem op de bodem van een cryohouder in en dompel deze onder in de vloeibare stikstof ter voorbereiding van bewaring van de gevitrificeerde monsters.
3. Bepaal het aantal monsters voor vitrificatie.
4. Label elke steriele petrischaal (of deksel) en elk bewaarhulpmiddel voor cryobuisjes met de nodige informatie.
5. Keer vóór gebruik elke flacon met ES en VS tweemaal voorzichtig om, zodat de inhoud gemengd wordt.
6. Prepareer als volgt de schaal met druppels van de oplossingen voor de vitrificatieprocedure:

A. Vitrificatieprotocol voor OÖCYTEN (MI):

OPMERKING 1: Opgehaalde oöcyten moeten met hyaluronidase worden gedenudeerd om te bevestigen dat ze MI zijn.

OPMERKING 2: Raadpleeg deel B voor het vitrificatieprotocol voor embryo's.

1. Pipetteer op aseptische wijze een druppel van 20 µl kweekmiddel, Modified HTF - HEPES met eiwit, en ES dicht bij elkaar op een omgekeerde deksel van een steriele petrischaal, zoals weergegeven in afbeelding 1, en plaats de schaal op de microscooptafel:
 - één druppel van 20 µl Modified HTF (HEPES met eiwit)
 - drie druppels van 20 µl (60 µl in totaal) van ES (ES1, ES2, ES3)
2. Neem de kweekschaal met MI oöcyten uit de incubator en controleer de kwaliteit van de monsters onder de microscoop. Selecteer, indien mogelijk, alleen de oöcyt(en) in MI-fase van de beste kwaliteit.
OPGELET: Beperk tijdens het equilibreren in de H-, ES- en VS-druppels de blootstelling van monsters aan licht tot het minimum.
3. Breng de oöcyt(en) (maximaal 2 tegelijk) met een minimaal volume medium over van de kweekschaal (in de incubator) in de druppel H van 20 µl gedurende één minuut.
4. Meng de druppel H met ES1 (zie afbeelding 1, pijl 1) met de punt van de transferpipet en laat de twee oplossingen vanzelf mengen gedurende 2 minuten.
5. Meng vervolgens de druppel ES2 (pijl 2) met de eerder gemengde druppels en wacht 2 minuten.
6. Breng de oöcyt(en) met een minimaal volume oplossing over van de gemengde druppel naar de druppel ES3 gedurende 6–10 minuten. **NB:** Het equilibreren van oöcyten in ES3 is voltooid wanneer de dikte van de zona pellucida en van de perivitelline ruimte gelijk is. De oöcyt(en) zet(ten) zich binnen 3 minuten neer op de bodem van de druppel.
7. Tijdens het equilibreren in ES3:
Pipetteer op aseptische wijze één (1) druppel van 50 µl VS 2 minuten voordat het equilibreren voltooid is en prepareer de CryoTip (afbeelding 3), HSV Straw (afbeelding 4) of Cryolock (afbeelding 5) voor het laden:
NB: Controleer het vitrificatiehulpmiddel en de punt ervan zorgvuldig voordat u start met de procedure.
 - CryoTip: sluit deze met behulp van een connector of adapter aan op de Hamilton-spuif of op een geschikt aspiratiehulpmiddel om voor een goede afdichting te zorgen. **NB:** Houd de metalen beschermhuls over de getrokken fijne punt om deze te beschermen totdat u klaar bent om monsters te plaatsen.
 - HSV Straw: sluit het langste uiteinde van het blauwe kunststof inbrenghulpmiddel aan op het gekleurde uiteinde van de hanteerstaf.
 - Cryolock: maak de dop los.
8. De volgende stappen (9–13) moeten binnen 80–110 seconden voltooid zijn. **OPGELET:** Blootstelling van monsters aan VS moet beperkt worden om cytotoxiciteit te voorkomen. Monsters hebben de neiging te zweven in VS. Daarom moet de focus via de microscoop worden aangepast voor continue visualisatie tijdens blootstelling en moet de punt van de transferpipet dichtbij worden gehouden, zodat overbrenging tussen druppels VS snel kan plaatsvinden. Zie afbeelding 6.

9. Zuig, nadat het equilibreren in ES is voltooid, wat ES op in de transferpipet en breng het (de) monster(s) met een minimaal volume over vanuit de druppel ES in de druppel VS gedurende 30 seconden.
 10. Vul een heatseal de CryoTip als volgt (zie afbeelding 7a):
 - Schuif de metalen beschermhuls omhoog langs de CryoTip, zodat het uiteinde met de fijne breekbare punt bloot komt te liggen.
 - Terwijl u de CryoTip en de Hamilton-spuit vasthoudt en observatie verricht onder de microscoop, aspireert u zorgvuldig een klein volume VS op tot markering 1 op de CryoTip.
 - Terwijl u onder de microscoop blijft observeren, aspireert u het monster met VS zorgvuldig naar markering 2 op de CryoTip.
 - Observeer de CryoTip nu rechtstreeks en aspireer meer VS tot markering 3.
 - Het monster moet zich tussen markering 2 en markering 3 bevinden.
 - Heatseal (seal 1) de CryoTip bij (of net onder) markering 1 en schuif de beschermhuls weer omlaag om het breekbare uiteinde van de fijne punt af te dekken en te beschermen.
 - Verwijder de CryoTip zorgvuldig uit het aspiratiehulpmiddel en de adapter en heatseal (seal 2) vervolgens aan het brede uiteinde van de CryoTip boven markering 4.
 - Dompel de afgedekte CryoTip rechtstreeks in vloeibare stikstof (koelsnelheid van $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) (zie afbeelding 7b).
 - Laad en verzegel de HSV Straw als volgt:
 - Plaats het (de) monster(s) met behulp van een micropipet zorgvuldig in de gleuf van het capillaire staafje, op een afstand van 1 mm van het uiteinde. De druppel die het (de) monster(s) bevat, moet kleiner zijn dan $0,5\text{ }\mu\text{l}$. Maximaal 2 oöcyten of embryo's per capillair staafje.
 - Plaats het capillaire staafje en het inbrenghulpmiddel onmiddellijk in het rietje en duw totdat het rechthoekige gedeelte van het inbrenghulpmiddel in aanraking komt met het uitlopende uiteinde van het rietje.
 - Klem het rietje lichtjes tussen uw duim en vinger en verwijder het inbrenghulpmiddel.
 - Terwijl u het rietje nog steeds in dezelfde positie houdt, verzegelt u het open uiteinde met behulp van een SYMS-sealapparaat.
 - Houd het rietje met behulp van een pincet vast dicht bij de hanteerstaaf.
 - Dompel het gehele rietje snel verticaal onder in LN_2 . Roer het rietje een paar seconden voorzichtig heen en weer in LN_2 om te voorkomen dat er een isolerende luchtbeltenlaag rondom het rietje ontstaat.
 - Vul de Cryolock als volgt:
 - Plaats met behulp van een micropipet zorgvuldig maximaal 2 monsters op het concave oppervlak van de punt (aan dezelfde zijde als het Cryolock-loop) op een afstand van ongeveer 3 mm (1/8 inch) van de rand van de punt (gebruik de zwarte markering als referentie) en verwijder overtollige cryoprotectantoplossing, zodat er een minimaal volume vitrificatiemedium ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$) overblijft.
 - Optie A: Breng de punt onmiddellijk, en voordat de Cryolock in LN_2 wordt ondergedompeld, zorgvuldig in de dop aan en draai hem stevig aan totdat hij vastzit.
 - Optie B: Dompel de punt en de dop onmiddellijk onder in LN_2 . Wacht totdat de vorming van luchtbelten ophoudt en equilibratie mogelijk wordt. Breng de punt zorgvuldig in de dop in en draai hem strak genoeg aan totdat hij vastzit.
NB: Optie B is niet goedgekeurd voor gebruik in de Verenigde Staten.
 - Dompel de Cryolock snel onder in vloeibare stikstof.
NB: Bewaar de Cryolock altijd met de dop omlaag gericht.
 11. Plaats de gevitrificeerde CryoTip, HSV Straw of Cryolock in het in LN_2 ondergedompelde, gevulde cryobuisje of de beker (op de cryohouder). Doe de dop op het cryobuisje (of de beker) of bevestig het ondersteboven op een ander cryobuisje, zonder dop, om het gevitrificeerde hulpmiddel in vloeibare stikstof te kunnen plaatsen.
 12. Breng de tank met LN_2 dicht bij de LN_2 -cryovriezer en breng de cryohouder met inhoud over naar de cryovriezer voor langdurige bewaring.
- B. Vitrificatieprotocol voor EMBRYO'S (PN tot blastocyst):**
1. Pipetteer op aseptische wijze één druppel ES van $50\text{ }\mu\text{l}$ op een omgekeerde deksel van een petrischaal.
 2. Neem de kweeschaal met embryo's uit de incubator en controleer de kwaliteit van het (de) monster(s) onder de microscoop. Selecteer voor vitrificatie, indien mogelijk, het (de) embryo's van de beste kwaliteit.
 3. Breng voorzichtig het (de) monster(s) (maximaal twee tegelijk) met een minimaal volume medium over van de kweeschaal naar de druppel ES en start de timer.
Embryo's moeten langzaam equilibreren in de druppel ES door middel van vrije val gedurende 6–10 minuten.
NB: Het monster zal krimpen en daarna geleidelijk opnieuw zijn oorspronkelijke grootte aannemen, wat erop duidt dat het equilibreren voltooid is.
OPGELET: Beperk tijdens het equilibreren in de ES- en VS-druppels de blootstelling van monsters aan licht tot het minimum.
 4. Tijdens dit equilibreren in ES:
 - Maak één druppel VS-oplossing van $50\text{ }\mu\text{l}$ gereed zoals weergegeven in afbeelding 8 en prepareer de CryoTip, HSV Straw of Cryolock voor het laden.

Volg het protocol zoals hierboven beschreven (deel A –Vitrificatieprotocol voor oöcyten (MI)) vanaf stap 9 t/m stap 12 voor blootstelling aan VS-oplossingen, het laden van de CryoTip, HSV Straw of Cryolock, het onderdompelen in LN_2 en de langdurige bewaring.

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 Freeze 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.

Als extra voorzorgsmaatregel tijdens de preparatieprocedure raden wij aan elke CryoTip nadat deze uit de verpakking is gehaald, zorgvuldig te onderzoeken. Controleer de CryoTips vóór gebruik onder een geschikte vergroting (40x) op mogelijke transportschade (zoals gebroken of gescheurde punt).

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 plasmapools 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 Farmacopee 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 immunodeficiëntievirus (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: Wylączone do zastosowań profesjonalnych.

PRZEZNACZENIE

Zestaw Vit Kit-Freeze jest przeznaczony do użytku w procedurach wspomaganego rozrodu, które obejmują wtryfikację i przechowywanie ludzkich oocytów (MI), zygot, w których obecne są przedjądra (PN), do 3. dnia bruzdkowania w rozwoju zarodkowym oraz zarodków w stadium blastocysty. Ten zestaw jest przeznaczony do użytku z produktem CryoTip (nr katalogowy 40709) i zestawem Vitricification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) w celu optymalizacji odzysku próbek.

OPIS WYROBU

Roztwór **Equilibration Solution-ES** to roztwór pożywki Medium-199 zbuforowany HEPES, zawierający siarczan gentaminy, 7,5-procentowy (stęż. obj.) DMSO, 7,5-procentowy (stęż. obj.) glikol etylenowy i 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek Dextran Serum Supplement (DSS).

Roztwór **Vitricification Solution-VS** to roztwór pożywki Medium-199 zbuforowany HEPES, zawierający siarczan gentaminy, 15-procentowy (stęż. obj.) DMSO, 15-procentowy (stęż. obj.) glikol etylenowy, 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek DSS i roztwór sacharozy w stężeniu 0,5 M.

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-Freeze w stężeniu 20-procentowym (stęż. obj.), co daje końcowe łączne stężenie HSA równe 10 mg/ml i dekstranu równe 4 mg/ml.

Tych dwóch roztworów należy używać w odpowiedniej kolejności zgodnie z protokołem wtryfikacji, który obejmuje sekwencyjne przenoszenie oocytów/zarodków do mikrokropelek.

SKŁAD

Sole i jony

Chlorek sodu
Fosforan sodu
Chlorek potasu
Siarczan magnezu
Octan sodu
Chlorek wapnia
Chlorek choliny
Azotan żelaza(III)
Seryna
Treonina
Tryptofan
Walina
Hydroksypolina
Cystyna
Cysteina

Prolina

Tyrozyna

Alanina

Kwas asparaginowy

Kwas glutaminowy

Izoleucyna

Leucyna

Metionina

Fenylalanina

Seryna

Treonina

Tryptofan

Walina

Hydroksypolina

Cystyna

Cysteina

Antyoksydant

Glutacja

Inne

Siarczan adeniny

Deoksyrboza

Ryboza

Guanina

Uracyl

Ksantyna

Tymina

Hipoksantyna

Adenozyina

Witaminy i minerały

Kalcyferol

Kwas askorbinowy

Kwas aminobenzoowy

Kwas nikotynowy

Amid kwasu nikotynowego

Kwas pantotenowy

Ryboflawina

Tiamina

Biotyna

Pirydoksyna

Wodorosiarczyn sodu

Kwas foliowy

Alfa-tokoferol

Antybiotyki

Siarczan gentaminy

Substraty energetyczne

Glukoza

Inozytol

Białko

Albumina surowicy ludzkiej

Krioprotektant

Dekstran

Sacharoza

Glikol etylenowy

Dimetylosulfotlenek

Woda

Woda o jakości WFI

ZAPEWNIENIE JAKOŚCI

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

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

Roztwory i produkty CryoTip:

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

Badanie na zarodku mysim (jednokomórkowym) (rozwój $\geq 80\%$ 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.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Produkt CryoTip (nr katalogowy 40709) lub słomka HSV Straw (nr katalogowy 25246-25251) lub produkt Cryolock™ (nr katalogowy CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O) firmy Irvine Scientific, LLC
- Złącze firmy Irvine Scientific, LLC (nr katalogowy 40736) lub inny adapter
- Sterylna szalka Petriego (50 X 9 mm, Falcon 351006 lub odpowiednik)
- Krioprobówki (4,5 ml) lub kubki i pręty kriogeniczne
- Pożywka hodowlana Modified HTF - HEPES (nr katalogowy 90126) z dodatkiem białka
- Hialuronidaza (nr katalogowy 90101)
- Jednorazowe rękawiczki
- Strzykawka Hamilton GASTIGHT® (50 µl, nr katalogowy 80901) lub inny wyrób do aspiracji
- Pipety transferowe (pipety szklane lub końcówki do mikropipet o wewnętrznej średnicy końcówki ~200 µm)

- Pęseta lub szczypce
- Zgrzewarka impulsowa
- Zgrzewarka SYMS Sealer do słomek HSV Straw
- 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))

INSTRUKCJA UŻYCIA

Wymogi dotyczące objętości składników zestawu Vit Kit-Freeze (na jedno zastosowanie):

- Roztwór Equilibration Solution (ES):
60 µl w przypadku protokołu witrifikacji oocytów lub
50 µl w przypadku protokołu witrifikacji zarodków
- Roztwór Vitrification Solution (VS):
50 µl w przypadku protokołu witrifikacji
- 1 produkt CryoTip lub słomka HSV Straw lub produkt Cryolock (do przechowywania maksymalnie 2 oocytów/zarodków)
- 1 złącze

PROTOKÓŁ WITRYFIKACJI:

UWAGA: Procedury należy wykonywać w temperaturze pokojowej (20–27°C). Podczas wykonywania poniższych procedur NIE NALEŻY korzystać z podgrzewanego stolika mikroskopowego. **PRZESTROGA:** Podczas równoważenia oocytów/zarodków w roztworach ES i VS należy zminimalizować ich ekspozycję na światło.

1. Doprowadzić odpowiednie objętości roztworów ES i VS do temperatury pokojowej (20–27°C). **UWAGA:** Należy unikać wielokrotnego doprowadzania całej zawartości fiolek z roztworami ES i VS do temperatury pokojowej, gdy za każdym razem potrzebna jest tylko porcja 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. Do protokołu witrifikacji oocytów wymagana jest również pożywka Modified HTF (HEPES) z dodatkiem białka.
2. Napełnić zbiornik na ciekły azot ciekłym azotem — objętością wystarczającą do napełnienia zbiornika do głębokości 4 cali (10 cm) lub całkowitego zanurzenia krioprobówki znajdującej się na przecie — i umieścić go w pobliżu mikroskopu. Przymocować krioprobówkę lub kubek (bez zatyczki) do dolnego zacisku pręta kriogenicznego i zanurzyć w ciekłym azocie w celu przygotowania do przechowywania oocytów/zarodków po witrifikacji.
3. Określić liczbę oocytów/zarodków poddawanych witrifikacji.
4. Oznaczyć odpowiednimi danymi każdą sterylną szalkę Petriego (lub wieczko) oraz wyrób do przechowywania próbek w warunkach kriogenicznych.
5. Przed użyciem delikatnie odwrócić każdą fiolkę roztworu ES i VS dwa razy, aby wymieszać zawartość fiolek.
6. Przygotować szalkę z kropelkami roztworów do procedury witrifikacji zgodnie z poniższym opisem:

A. Protokół witrifikacji OOCYTÓW (MII):

UWAGA 1: W celu potwierdzenia stadium MII pobrane oocyty są poddawane denudacji hialuronidazą.

UWAGA 2: Protokół witrifikacji zarodków znajduje się w części B.

1. W sposób aseptyczny nanieść kropelki o objętości 20 µl na odwrócone wieczko sterylnej szalki Petriego — kropelkę pożywki hodowlanej, Modified HTF - HEPES z dodatkiem białka, i kropelki roztworu ES w niewielkiej odległości od siebie — zgodnie z Ryc. 1, a następnie umieścić szalkę na stoliku mikroskopowym:
 - jedna kropelka pożywki Modified HTF (HEPES z dodatkiem białka) o objętości 20 µl
 - trzy kropelki roztworu ES (ES1, ES2, ES3) o objętości 20 µl każda (łącznie 60 µl)
2. Wyjąć naczynie hodowlane zawierające oocyty w stadium MII z inkubatora i sprawdzić ich jakoś pod mikroskopem. Jeśli jest to możliwe, wybrać jedynie oocyty w stadium MII charakteryzujące się najlepszą jakością. **PRZESTROGA:** Podczas równoważenia oocytów w kropelkach pożywki H i roztworów ES i VS należy zminimalizować ich ekspozycję na światło.
3. Przenieść oocyty (maksymalnie 2 jednocześnie) w minimalnej objętości pożywki z naczynia hodowlanego (z inkubatora) do kropelki pożywki H o objętości 20 µl i pozostawić na jedną minutę.
4. Połączyć kropelkę pożywki H z kropelką ES1 (patrz Ryc. 1, strzałka 1) przy użyciu końcówki pipety transferowej i pozostawić na 2 minuty, aby umożliwić samoistne wymieszanie się obu roztworów.
5. Następnie połączyć kropelkę ES2 (strzałka 2) z uprzednio połączonymi kropelkami i pozostawić na 2 minuty.
6. Przenieść oocyty w minimalnej objętości roztworu uzyskanego w wyniku połączenia kropelki ES3 i pozostawić na 6–10 minut. **Uwaga:** Równoważenie oocytów w kropelce ES3 można uznać za zakończone, gdy grubość osłonki przejrzystej będzie równa przestrzeni okołozótkowej. Oocyty osiadać na dnie kropelki w ciągu 3 minut.
7. Podczas równoważenia oocytów w kropelce ES3:
2 minuty przed zakończeniem równoważenia w sposób aseptyczny nanieść jedną (1) kropelkę roztworu VS o objętości 50 µl i przygotować produkt CryoTip (Ryc. 3), słomkę HSV Straw (Ryc. 4) lub produkt Cryolock (Ryc. 5) do załadowania:
UWAGA: Przed rozpoczęciem procedury uważnie obejrzyć wyrób stosowany do witrifikacji i jego końcówkę.
 - Produkt CryoTip: przymocować do strzykawki Hamilton lub odpowiedniego wyrobu do aspiracji, używając złącza lub adaptera, aby zapewnić ścisłe połączenie. **UWAGA:** Metalowa osłonka powinna pozostać nasunięta na cienką końcówkę do czasu ładowania oocytów, aby chronić ją przed uszkodzeniem.
 - Słomka HSV Straw: podłączyć dłuższy koniec niebieskiego, wykonanego z tworzywa sztucznego wyrobu wprowadzającego do kolorowego końca przecinka manipulacyjnego.
 - Produkt Cryolock: zdjąć zatyczkę.

8. Poniższe kroki (9–13) należy wykonać w ciągu 80–110 sekund. **PRZESTROGA:** Należy ograniczyć ekspozycję oocytów na rozwój VS, aby uniknąć cytotoksycznego działania roztworu. Oocyty mają tendencję do unoszenia się w roztworze VS, dlatego należy dostosować ostrość mikroskopu, aby zapewnić ciągłą obserwację oocytów podczas ekspozycji na roztwór, i trzymać końcówkę pipety transferowej w pobliżu, aby zapewnić szybkie przenoszenie oocytów pomiędzy kropelkami roztworu VS. Patrz Ryc. 6.
9. Po zrównoważeniu oocytów w roztworze ES pobrać małą objętość roztworu ES do pipety transferowej, a następnie przenieść oocyt(y) w minimalnej objętości roztworu z kropelki roztworu ES do kropelki roztworu VS na 30 sekund.
10. Załadować produkt CryoTip i zgrzać go zgodnie z poniższym opisem (patrz Ryc. 7a):
 - Przesunąć metalową osłonkę w górę produktu CryoTip, aby odsłonić czubek cienkiej, delikatnej końcówki.
 - Manipulując produktem CryoTip i strzykawką Hamilton pod mikroskopem, ostrożnie zaaspirować małą objętość roztworu VS do znacznika nr 1 na produkcie CryoTip.
 - Kontynuując obserwację pod mikroskopem, delikatnie zaaspirować oocyt w roztworze VS do znacznika nr 2 na produkcie CryoTip.
 - Obserwując produkt CryoTip gołym okiem, zaaspirować większą objętość roztworu VS do znacznika nr 3.
 - Oocyt musi znajdować się pomiędzy znacznikiem nr 2 a znacznikiem nr 3.
 - Zgrzać produkt CryoTip na poziomie znacznika nr 1 (lub tuż pod tym znacznikiem) (zgrzew nr 1), a następnie zsunąć metalową osłonkę, aby osłaniała i ochraniała ona cienką, delikatną końcówkę.
 - Ostrożnie wyjąć produkt CryoTip z wyrobu do aspiracji i adaptera, a następnie zgrzać produkt przy wąskim końcu produktu CryoTip, nad znacznikiem nr 4 (zgrzew nr 2).
 - Zanurzyć osłonięty produkt CryoTip bezpośrednio w ciekłym azocie (szybkość chłodzenia –12 000 °C/min) (patrz Ryc 7b).

Załadować słomkę HSV Straw i zgrzać ją zgodnie z poniższym opisem:

 - Używając mikropipety, ostrożnie umieścić oocyt(y) w rowku precjka kapilarnego, około 1 mm od końca. Kropelka zawierająca oocyt(y) musi mieć objętość poniżej 0,5 µl. W każdym precjku kapilarnym można umieścić maksymalnie 2 oocyty lub zarodki.
 - Niezwłocznie umieścić precjek kapilarny i wyrób wprowadzający w słomce i docisnąć, aż prostokątna część wyrobu wprowadzającego zetknie się z rozszerzonym końcem słomki.
 - Delikatnie ścisnąć słomkę między kciukiem a palcem, a następnie wyjąć wyrób wprowadzający.
 - Trzymając słomkę nieruchomo, zgrzać otwarty koniec słomki przy użyciu zgrzewarki SYMS Sealer.
 - Trzymać słomkę pęsetą za precjek manipulacyjny.
 - Trzymając słomkę pionowo, szybko zanurzyć ją w LN₂. Delikatnie poruszać słomką w LN₂ przez kilka sekund, aby uniknąć wytworzenia izolującej warstwy pęcherzyków powietrza wokół słomki.

Załadować produkt Cryolock zgodnie z poniższym opisem:

 - Używając mikropipety, ostrożnie umieścić maksymalnie 2 oocyty na wklęsłej powierzchni końcówki (strona, na której znajduje się logo Cryolock) około 3 mm (1/8 cala) od krawędzi końcówki (czarny znacznik to punkt odniesienia), usuwając nadmiar roztworu krioprotektantu, pozostawiając możliwie jak najmniejszą objętość pożywki do wityfikacji (≤1 µl).
 - Opcja A: Bezpośrednio przed zanurzeniem produktu Cryolock w LN₂ ostrożnie wsunąć końcówkę do zatyczki i dokręcić ją.
 - Opcja B: Od razu zanurzyć końcówkę w LN₂ i dopiero wtedy ją zamknąć. Poczekać, aż przestaną wydostawać się pęcherzyki powietrza, aby zrównoważyć roztwór. Ostrożnie wsunąć końcówkę do zatyczki i dokręcić ją.

UWAGA: Opcja B nie została dopuszczona do stosowania w Stanach Zjednoczonych.

 - Szybko zanurzyć produkt Cryolock w ciekłym azocie.

UWAGA: Produkt Cryolock należy zawsze przechowywać z zatyczką skierowaną w dół.

- 11. Umieścić produkt CryoTip, słomkę HSV Straw lub produkt Cryolock do wityfikacji w zanurzonej krioprobówce lub zanurzonym kubku (na precjcie kriogenicznym) wypełnionej(-ym) LN₂. Zamknąć zatyczką krioprobówkę (lub kubek) lub przymocować do góry dnem inną niezamkniętą krioprobówkę w celu zabezpieczenia wyrobu do wityfikacji w ciekłym azocie.
- 12. Umieścić zbiornik na LN₂ w pobliżu kriozamrażarki z LN₂, a następnie przenieść pręt kriogeniczny z jego zawartością do kriozamrażarki w celu długoterminowego przechowywania.

B. ZARODKI (od zygot, w których obecne są PN, do zarodków w stadium blastocysty):

Protokół wityfikacji:

1. W sposób aseptyczny nanieść jedną kropelkę roztworu ES o objętości 50 µl na odwrócone wieczko szalki Petriego.
 2. Wyjąć naczynie hodowlane zawierające zarodki z inkubatora i sprawdzić ich jakość pod mikroskopem. Jeśli jest to możliwe, wybrać do wityfikacji jedynie zarodki charakteryzujące się najlepszą jakością.
 3. Ostrożnie przenieść zarodki (maksymalnie 2 jednocześnie) w minimalnej objętości pożywki z naczynia hodowlanego (z inkubatora) do kropelki roztworu ES i uruchomić minutnik.
- Równoważenie zarodków w kropelce ES powinno przebiegać powoli; zarodki powinny swobodnie opadać przez 6–10 minut.
- Uwaga: Zarodek skurczy się, a następnie stopniowo wróci do pierwotnego rozmiaru, co będzie oznaczać ukończenie równoważenia.
- PRZESTROGA:** Podczas równoważenia zarodków w kropelkach roztworów ES i VS należy zminimalizować ekspozycję na światło.
4. Podczas równoważenia zarodków w kropelce roztworu ES:
 - Nanieść jedną kropelkę roztworu VS o objętości 50 µl, tak jak to przedstawiono na Ryc. 8, i przygotować produkt CryoTip, słomkę HSV Straw lub produkt Cryolock do załadowania.

Postępować zgodnie z powyższym protokołem (sekcja A — protokół wtryfikacji oocytów [MI]), wykonując kroki od 9 do 12 dotyczące ekspozycji na roztwory VS, ładowania produktu CryoTip, słomki HSV Straw lub produktu Cryolock, zanurzania wyrobów w LN₂ i długoterminowego przechowywania.

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

INSTRUKCJE DOTYCZĄCE PRZECIECZNOŚCI I STABILNOŚCI

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

Po otwarciu fiolek należy użyć pożywki 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.

Jako dodatkowy środek ostrożności podczas procedury przygotowania zaleca się dokładne sprawdzenie każdego produktu CryoTip po wyjściu go z opakowania. Przed użyciem produkty CryoTip należy obejrzeć pod odpowiednim powiększeniem (40x) pod kątem możliwych uszkodzeń (takich jak pęknięcia lub złamania końcówki), które mogły wystąpić podczas transportu.

Nie używać żadnej fiołki z roztworem, która wygląda na uszkodzoną, przeciekającą, jeśli w roztworze obecne są cząstki stałe lub zmętnienie oraz jeśli roztwór zmienił kolor. Zutyliizować 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 wtryfikacji 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 swoistych 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 nieznanymi 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 zakaźne. Ze wszystkimi produktami pochodzenia ludzkiego należy postępować tak, jakby mogły przenosić one zakażenie, stosując uniwersalne środki ostrożności. Dawcy tych materiałów źródłowych zostali także przebadani na obecność choroby Creutzfeldta-Jacoba (CJD).

PRZECIWWSKAZANIE

Produkt zawiera siarczan gentamycyny. Należy zastosować odpowiednie środki ostrożności w celu upewnienia się, że pacjentka nie jest uczulona na tego rodzaju antybiotyki.

AVERTIZARE UE: Numai pentru uz profesional.

INDICAȚII DE UTILIZARE

Vit Kit-Freeze este destinat utilizării în proceduri de reproducere asistată pentru vitrificarea și depozitarea ovocitelor umane (MI), a zigotilor pronucleari (PN) pentru embrioni în stadiul de clivaj până în ziua 3 și embrioni în stadiul de blastocist. Această trusă a fost proiectată pentru utilizare cu CryoTip (Catalog #40709) și Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) pentru recuperarea optimă a speciimenelor.

DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

Equilibration Solution-ES este o soluție tamponată cu HEPES de Medium-199 care conține sulfat de gentamicină, 7,5 % (v/v) atât de DMSO, cât și de etilenglicol și 20 % (v/v) de Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS este o soluție tamponată cu HEPES de Medium-199 care conține sulfat de gentamicină, 15 % (v/v) atât de DMSO, cât și de etilenglicol și 20 % (v/v) de Dextran Serum Supplement (DSS) și 0,5 M sucroză.

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-Freeze pentru o concentrație finală de 10 mg/ml de HSA și 4 mg/ml de dextran.

Aceste două soluții vor fi folosite în ordinea corespunzătoare, conform protocolului etapizat de vitrificare a micropicăturilor.

COMPOZIȚIE

Săruri și ioni

Clorură de sodiu
Fosfat de sodiu
Clorură de potasiu
Sulfat de magneziu
Acetat de sodiu
Clorură de calciu
Clorură de colină
Azotat de fier

Prolină
Tirozină
Alanină
Acid aspartic
Acid glutamic
Izoleucină
Leucină
Metionină
Fenilalanină
Serină

Soluție tampon

Carbonat acid de sodiu
HEPES

Indicador pH

Roșu de fenol

Aminoacizi

Arginină
Glicină
Histidină
Lizină

Treonină
Tryptofan
Valină
Hidroxiprolină
Cistină
Cisteină
Antioxidant
Glutation

Altul

Sulfat de adenină
Deoxiriboză
Riboză
Guanină
Uracil
Xantină
Timină
Hipoxantină
Adenozină
Vitamine și minerale
Calciferol
Acid ascorbic
Acid aminobenzoic
Acid nicotinic
Amidă de acid nicotinic
Acid pantotenic
Riboflavină
Tiamină
Biotină
Piridoxină

Bisulfid de sodiu
Acid folic
Alfa-tocoferol

Antibiotice

Sulfat de gentamicină

Substraturi energetice

Glucoză
Inozitol

Proteină

Albumină serică umană

Crioprotector

Dextran
Zaharoză
Etilen-glicol
Dimetilsulfoxid

Apă

Calitate WFI (water for injection - apă pentru preparate injectabile)

ASIGURAREA CALITĂȚII

Soluțiile din Vit Kit-Freeze sunt filtrate prin membrană și prelucrate aseptice conform unor procese de fabricație validate.

Fiecare lot de Vit Kit-Freeze este supus următoarelor teste:

Soluții și paiete CryoTip.

Endotoxină prin metoda Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Analiza embrionului de șoarece (o celulă) (≥ 80 % blastocist expandat)

Sterilitatea prin testul de sterilitate actual prevăzut de Farmacopeea Americană <71> (reuși)

Toate rezultatele se înregistrează într-un Certificat de analiză separat pentru fiecare lot, care este disponibil la cerere.

MATERIALE CARE SUNT NECESARE, DAR NU SUNT INCLUSE

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (Catalog #40709) sau paietă HSV (Catalog #25246-25251) sau Cryolock™ (Catalog #CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC conector (Catalog #40736) sau alt adaptor
- Vase Petri sterile (50 X 9 mm, Falcon 351006 sau echivalent)
- Criotuburi (4,5 ml) sau cupe și tije Cryocane
- Mediu de cultură Modified HTF - HEPES (Catalog #90126), suplimentat cu proteine
- Hialuronidază (Catalog #90101)
- Mănuși de unică folosință
- Seringă Hamilton GASTIGHT® (50 μ L, Catalog #80901) sau alt instrument de aspirare
- Pipete de transfer (pipete Pasteur din sticlă sau vârfuri de micropipete cu un diametru interior al vârfului de ~200 μ m)
- Clește sau pensetă
- Dispozitiv pentru sigilare termică cu impulsuri
- Dispozitiv de sigilare SYMS pentru paiete HSV

- 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 inch (10 cm) în rezervor)

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Componente Vit Kit-Freeze (la fiecare aplicație):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl pentru Protocolul de vitrificare a ovocitelor sau
50 µl pentru Protocolul de vitrificare a embrionilor
- Vitrification Solution (VS):
50 µl pentru protocolul de vitrificare
- 1 paietă CryoTip sau HSV sau Cryolock (depozitează până la 2 specimene)
- 1 conector

PROTOCOLUL DE VITRIFICARE:

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 echilibrării în soluțiile ES și VS.

1. Aduceți la temperatura camerei (20-27 °C) cantitatea de ES și VS pe care o veți folosi. **NOTĂ:** Evitați aducerea la temperatura camerei în mod repetat a fiolelor întregi de ES și VS, când este nevoie de o parte din 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. Modified HTF (HEPES) cu proteine este de asemenea necesar în protocolul de vitrificare a ovocitelor.
2. Umpleți rezervorul de azot lichid cu azot lichid (suficient pentru a obține o adâncime de 4 inch (10 cm) sau pentru a scufunda criotubul complet pe tijă) și așezați-l aproape de microscop. Atașați un criotub sau o cupă (fără capac) de clema de jos a tijei Cryocane și scufundați în azot lichid în pregătirea pentru depozitarea specimenelor vitrificate.
3. Stabiliți câte specimene trebuie vitrificate.
4. Etichetați fiecare vas Petri steril (sau capac) și dispozitivul de depozitare criogenică cu informațiile necesare.
5. Răsturnați ușor fiecare fiolă de ES și VS de două ori pentru a amesteca conținutul înainte de utilizare.
6. Pregătiți vasul cu picături de soluții pentru Procedura de vitrificare, după cum urmează:

A. Protocolul de vitrificare a OVOCITELOR (MII):

NOTA 1: Ovocitele recoltate urmează să fie denudate cu hialuronidază pentru a confirma că sunt MII.

NOTA 2: Consultați Secțiunea B pentru protocolul de vitrificare a embrionilor.

1. Distribuți aseptice câte o picătură de 20 µl de mediu de cultură, Modified HTF - HEPES cu proteine și ES, aproape una de cealaltă, pe un capac întors al unui vas Petri steril, așa cum se arată în figura 1, și așezați vasul pe placa microscopului:
 - o picătură de 20 µl de Modified HTF (HEPES cu proteine)
 - trei picături de 20 µl (60 µl în total) de ES (ES1, ES2, ES3)
2. Scoateți vasul de cultură care conține ovocitele MII din incubator și verificați calitatea specimenelor la microscop. Dacă este posibil, selectați doar ovocitul/ovocitele din stadiul MII de cea mai bună calitate. **AVERTIZARE:** Reduceți la minimum expunerea specimenului/specimenelor la lumină în timpul echilibrării în picăturile de H, ES și VS.
3. Transferați ovocitele (maximum 2 în același timp) cu un volum minim de mediu din vasul de cultură (în incubator) în picătura de 20 µl de H și lăsați un minut.
4. Înglobați picătura de H în ES1 (vezi fig. 1, săgeata 1) cu vârful unei pipete de transfer și permiteți amestecul spontan al celor două soluții timp de 2 minute.
5. Apoi înglobați picătura de ES2 (săgeata 2) în picăturile înglobate anterior și lăsați timp de 2 minute.
6. Transferați ovocitul/ovocitele cu un volum minim de soluție din picătura înglobată în picătura de ES3 și lăsați timp de 6-10 minute. **Notă:** echilibrarea ovocitului/ovocitelor în ES3 este completă atunci când grosimile zonei pellucida și spațiului perivitelin sunt egale. Ovocitul/ovocitele se vor depune la fundul picăturii în 3 minute.
7. În timpul perioadei de echilibrare în ES3:
Distribuți aseptice o (1) picătură de 50 µl de VS timp de 2 minute înainte de finalizarea echilibrării și pregătiți paieta CryoTip (fig. 3), paieta HSV (fig. 4) sau Cryolock (fig. 5) pentru încărcare:
NOTĂ: Verificați cu atenție dispozitivul de vitrificare și vârful înainte de a începe procedura
 - CryoTip: conectați-vă la seringă Hamilton sau la un instrument de aspirare adecvat folosind un conector sau un adaptor pentru a asigura o sigilare ermetică. **NOTĂ:** Țineți manșonul metalic de protecție peste vârful fin fragil pentru a-l proteja până când este gata de încărcarea specimenelor.
 - Paieta HSV: conectați capătul mai lung al dispozitivului de inserare din plastic albastru la capătul colorat al tijei de manevrare.
 - Cryolock: detașați capacul.
8. Următorii pași (9-13) trebuie efectuați în 80-110 secunde. **AVERTIZARE:** Expunerea specimenelor la VS trebuie limitată pentru prevenirea citotoxicității. Specimenul/specimenele tind să plutească în VS, așa că ajustați focalizarea microscopului pentru a păstra o vizualizare continuă în timpul expunerii și țineți vârful pipetei de transfer în apropiere pentru a asigura transferul rapid între picături VS. Consultați figura 6.
9. După ce echilibrarea în ES este finalizată, extrageți o cantitate de ES în pipeta de transfer și transferați specimenul/specimenele cu un volum minim din picătura de ES în picătura de VS și lăsați-le timp de 30 de secunde.

10. Încărcați și sigilați termic paieta CryoTip după cum urmează (vezi figura 7a):
 - Glisați manșonul metalic de protecție de-a lungul paietei CryoTip pentru a expune capătul vârfului fin fragil.
 - În timp ce manevrați paieta CryoTip și seringă Hamilton și observați la microscop, aspirați cu atenție un volum redus de VS până la gradația 1 de pe CryoTip.
 - Continuați să observați la microscop și aspirați ușor specimenul cu VS până la gradația a 2-a de pe CryoTip.
 - Acum observați paieta CryoTip direct și aspirați mai multă VS până la gradația a 3-a.
 - Specimenul trebuie să fie poziționat între gradația a 2-a și gradația a 3-a.
 - Sigilați termic (sigiliul 1) paieta CryoTip în dreptul gradației 1 (sau imediat sub ea) și glisați din nou manșonul de protecție în jos pentru a acoperi și proteja vârful fin fragil.
 - Îndepărtați cu atenție paieta CryoTip de pe instrumentul de aspirare și adaptor, apoi sigilați termic (sigiliul 2) capătul gros al paietei CryoTip deasupra gradației a 4-a.
 - Scufundați paieta CryoTip acoperită direct în azotul lichid (ritm de răcire –12,000 °C/min) (vezi figura 7b).
 - Încărcați și sigilați paieta HSV după cum urmează:
 - Folosind o micropipetă, depuneți cu atenție specimenul/specimenele în șanțul tijei capilare la 1 mm de capăt. Picătura care conține specimenul/specimenele trebuie să fie mai puțin de 0,5 µl. Se vor folosi maximum 2 ovocite sau embrioni pentru fiecare tijă capilară.
 - Introduceți imediat tija capilară și dispozitivul de manevrare în paietă și împingeți până când porțiunea dreptunghiulară a dispozitivului de manevrare vine în contact cu capătul evazat al paietei.
 - Strângeți ușor paieta între degetul mare și cel arătător și îndepărtați dispozitivul de inserare.
 - În timp ce țineți paieta fix, sigilați capătul deschis folosind un dispozitiv de sigilare SYMS.
 - Țineți paieta cu ajutorul unei pensete în zona tijei de manevrare.
 - Scufundați rapid toată paieta în LN₂ vertical. Agitați ușor paieta în LN₂ pentru câteva secunde, pentru a evita formarea unui strat izolant de bule de aer în jurul paietei.
 - Încărcați Cryolock după cum urmează:
 - Folosind o micropipetă, încărcați cu atenție maximum 2 specimene pe suprafața concavă a vârfului (pe partea cu logoul Cryolock) la aproximativ 3 mm (1/8 inch) de marginea vârfului (utilizați marcajul negru ca referință), îndepărtând orice exces de soluție crioprotectoare lăsând un volum de medii de vitrificare cât mai mic posibil (≤1 µL).
 - Opțiunea A: Imediat și înainte de a scufunda Cryolock în LN₂, introduceți cu atenție vârful în capac răsucind până la fixare.
 - Opțiunea B: Scufundați imediat vârful și capacul sub LN₂. Așteptați oprirea formării de bule pentru a permite echilibrarea. Introduceți cu atenție vârful în capac, răsucind suficient pentru fixare.
- NOTĂ: Opțiunea B nu a fost aprobată pentru a fi utilizată în S.U.A.
- Scufundați rapid Cryolock în azot lichid.
- NOTĂ: Depozitați întotdeauna Cryolock cu capacul în jos.
11. Așezați paieta CryoTip, paieta HSV sau Cryolock vitrificate în criotubul sau cupa scufundate în LN₂ (pe tija Cryocane). Acoperiți criotubul (sau cupa) cu un capac sau uniți-l cu fața în jos cu un alt criotub fără capac pentru a fixa dispozitivul vitrificat în azot lichid.
 12. Mutați rezervorul cu LN₂ aproape de congelatorul criogenic cu LN₂ și transferați tija Cryocane împreună cu conținutul său în congelatorul criogenic pentru depozitare pe termen lung.

B. EMBRIONI (PN până la blastocist):

Protocolul de vitrificare:

1. Distribuți aseptice o (1) picătură de 50 µl de ES pe un capac întors al unui vas Petri.
 2. Scoateți vasul de cultură cu embrionul/embrionii din incubator și verificați calitatea specimenului/specimenelor la microscop. Dacă este posibil, selectați doar embrionul/embrionii de cea mai bună calitate.
 3. Transferați cu atenție specimenul (maximum două în același timp) cu un volum minim de mediu din vasul de cultură în picătura de ES și porniți temporizatorul.
- Embrionii ar trebui să se echilibreze în picătura de ES ușor, prin cădere liberă, timp de 6-10 minute.
- Notă: Specimenul se va contracta și apoi va reveni treptat la dimensiunea inițială, ceea ce arată că echilibrarea s-a finalizat.
- AVERTIZARE:** Reduceți la minimum expunerea specimenului/specimenelor la lumină în timpul echilibrării în picăturile de ES și VS.
4. În timpul perioadei de echilibrare în ES:
 - pregătiți o picătură de 50 µl de soluție VS, așa cum se arată în fig. 8, și pregătiți paieta CryoTip, paieta HSV sau Cryolock pentru încărcare.

Urmați protocolul descris mai sus (Secțiunea A - Protocolul de vitrificare a ovocitelor [MI]), pașii 9 - 12, pentru expunere la soluțiile VS, încărcarea paietei CryoTip, a paietei HSV sau a Cryolock, scufundare în LN₂ și depozitare pe termen lung.

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-Freeze 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.

Ca măsură de precauție suplimentară în timpul procedurii de pregătire, recomandăm verificarea atentă a fiecărei paiete Cryotip la scoaterea din ambalaj. Înainte de utilizare, paietele CryoTip ar trebui verificate sub mărire corespunzătoare (mărire 40x) pentru a se depista posibilele deteriorări (cum ar fi rupturile sau crăpăturile vârfului) care este posibil să se fi produs în timpul transportului.

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-Freeze är avsett att användas för procedurer för assisterad befruktning, för vitrifiering och lagring av humana oocyter (MI), prokärna-zygoter (PN) t.o.m. embryon i klyvningsfas dag 3 och embryon i blastocyststadium. Detta kit är utformat för användning med CryoTip (katalognr 40709), och Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) för optimal återhämtning av preparat.

PRODUKTBESKRIVNING

Equilibration Solution-ES är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 innehållande gentamicinsulfat, 7,5 % (v/v) av såväl DMSO som etylenglykol, samt 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 innehållande gentamicinsulfat, 15 % (v/v) av såväl DMSO som etylenglykol, 20 % (v/v) DSS samt 0,5 M sukros.

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-Freeze för en slutlig koncentration på 10 mg/ml HSA och 4 mg/ml dextran.

Dessa två lösningar ska användas i ordningsföljd enligt protokollet för stegvis vitrifiering av mikrodroppar.

SAMMANSÄTTNING

Salter och joner

Natriumklorid
Natriumfosfat
Kaliumklorid
Magnesiumsulfat
Natriumacetat
Kalciumklorid
Kolinklorid
Ferrinitrat

Buffer

Natriumbikarbonat
HEPES

pH-indikator

Fenolrött

Aminosyror

Arginin
Glycin
Histidin
Lysin

Prolin
Tyrosin
Alanin
Asparaginsyra
Glutaminsyra
Isoleucin
Leucin
Metionin
Fenylalanin
Serin
Treonin
Tryptofan
Valin
Hydroxiprolin
Cystin
Cystein

Antioxidant

Glutation

Övrigt

Adenosinsulfat
Deoxiribos
Ribos
Guanin
Uracil
Xantin
Tymin
Hypoxantin
Adenosin

Vitaminer och mineraler

Kalciferol
Askorbinsyra
Aminobensoesyra
Nikotinsyra
Niacin
Pantotensyra
Riboflavin
Tiamin
Biotin

Pyridoxin
Natriumbisulfid
Folsyra
Alfa-tokoferol

Antibiotika

Gentamicinsulfat

Energisubstrat

Glukos
Inositol

Protein

Humant serumalbumin

Kryoprotektant

Dextran
Sukros
Etylenglykol
Dimetylsulfoxid

Vatten

Vatten för injektion (WFI)

KVALITETSSÄKRING

Lösningarna i Vit Kit-Freeze är membranfiltrerade och aseptiskt bearbetade enligt validerade tillverkningsförfaranden.

Varje lot Vit Kit-Freeze utsätts för följande tester:

Lösningar och CryoTip.

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.

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (katalognr 40709) eller HSV-strå (katalognr 25246-25251) eller Cryolock™ (katalognr CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC sprutkoppling (katalognr 40736) eller annan adapter
- Sterila petriskålar (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller motsvarande)
- Kryorör (4,5 ml) eller -burkar och hållare för kryorör
- Modified HTF – HEPES (katalognr 90126) odlingsmedium med proteintillsats
- Hyaluronidas (katalognr 90101)
- Engångshandskar
- Hamilton GASTIGHT® spruta (50 μ l, katalognr 80901) eller annat aspireringsinstrument
- Transferpipetter (glaspipetter med utdragen spets eller mikropipettspetsar med en inre spetsdiameter på cirka 200 μ m)
- Pincett eller tång
- Värmeförseglare
- SYMS förseglare för HSV-strå
- 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)

BRUKSANVISNING

Vit Kit-Freeze-komponenter som krävs (per applikation):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl för oocytvitrifieringsprotokoll
eller
50 µl för embryovitrifieringsprotokoll
- Vitrification Solution (VS):
50 µl för vitrifieringsprotokollet
- 1 CryoTip eller HSV-strå eller Cryolock (förvarar upp till 2 preparat)
- 1 sprutkoppling

VITRIFIERINGSPROTOKOLL:

ANM: Proceduren måste utföras vid rumstemperatur (20–27 °C). Uppvärm korskord på mikroskop får INTE användas till följande procedurer. FÖRSIKTIGHET! Minimera exponering av preparaten för ljus under ekvibrering i ES- och VS-lösningarna.

1. Låt de volymer av ES och VS som ska användas uppnå rumstemperatur (20–27 °C). ANM: Undvik att upprepade gånger låta hela ampullerna med ES och VS uppnå rumstemperatur när bara en del av lösningen behövs varje gång. Det är bättre att alikvotera den volym som ska användas och genast sätta tillbaka ampullerna i kylskåpet vid 2–8 °C efter alikvotering. Modified HTF (HEPES) med protein krävs också för oocyt-vitrifieringsprotokollet.
2. Fyll behållaren för flytande kväve med flytande kväve (tillräckligt för att åstadkomma ett djup på 4 tum (10 cm) eller så att kryorören på hållaren är helt nedsänkta) och placera den nära intill mikroskopet. Sätt fast kryoröret eller -burken (utan lock) på den nedersta klämman på en hållare för kryorör och sänk ned hållaren i det flytande kvävet för att förbereda lagringen av de vitrifierade preparaten.
3. Bestäm hur många preparat som ska vitrifieras.
4. Märk varje steril petriskål (eller lock) och kryoförvaringsenheten med nödvändig information.
5. Vänd varje ampull med ES och VS varsamt två gånger för att blanda innehållet före användning.
6. Förbered en skål med droppar av lösning för vitrifieringsproceduren på följande sätt:

A. Protokoll för vitrifiering av OOCYT (MII):

ANM 1: Uttagna oocyter ska denuderas med hyaluronidas för att bekräfta att de är MII.

ANM 2: Se avsnitt B för embryovitrifieringsprotokoll.

1. Dispensera aseptiskt en 20 µl-drope av odlingsmedium, Modified HTF – HEPES med protein, och ES nära intill varandra på ett upp-och-nedvänt sterilt petriskålock, så som visas i figur 1, och placera skålen på mikroskopets korskord:
 - en 20 µl-drope Modified HTF (HEPES med protein)
 - tre 20 µl-droppar (sammanlagt 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Ta ut odlingskålen med MII-oocyter från inkubatorn och kontrollera preparatets kvalitet under mikroskop. Välj endast stadie MII-oocyt(er) av bästa kvalitet, när så är möjligt.
FÖRSIKTIGHET! Minimera exponering av preparatet(-en) för ljus under ekvibrering i H-, ES- och VS-dropparna.
3. För över oocyten (högst två på en gång) med en minimal volym medium från odlingskålen (i inkubatorn) till 20 µl-droppen H och låt stå i en minut.
4. För ihop H-droppen och ES1-droppen (se figur 1, pil 1) med hjälp av transferpipettens spets och låt de två lösningarna blandas spontant under 2 minuter.
5. För sedan ihop ES2-droppen (pil 2) med de redan sammanförda dropparna och låt stå i 2 minuter.
6. För över oocyten(-erna) med en minimal volym lösning från den sammanförda droppen till ES3-droppen och låt stå i 6–10 minuter. Anm: Ekvibreringen av oocyten(-erna) i ES3 är fullbordad när zona pellucida och det perivitellina rummet har samma tjocklek. Oocyten(oocyterna) sjunker till botten av droppen inom 3 minuter.
7. Under ekvibreringsperioden i ES3:
Dispensera aseptiskt en (1) 50 µl-drope VS 2 minuter före fullständig ekvibrering och förbered CryoTip (figur 3), HSV-strået (figur 4) eller Cryolock (figur 5) för laddning:
ANM: Undersök vitrifieringsenheten och spetsen noggrant innan proceduren påbörjas.
 - CryoTip: Anslut den till Hamilton-sprutan eller lämpligt aspireringsinstrument med hjälp av en sprutkoppling eller adapter så att en tät försegling säkerställs. ANM: Låt metallskyddet sitta kvar över den fina utdragna spetsen så att den skyddas tills det är dags att ladda preparaten.
 - HSV-strå: Anslut den längre änden på den blå införsenheten av plast till hanteringsstavens färgade ände.
 - Cryolock: Ta av locket.
8. Följande steg (9–13) ska utföras inom 80–110 sekunder. FÖRSIKTIGHET! För att förhindra cytotoxicitet ska preparatets exponering för VS begränsas. Preparat tenderar att flyta i VS, så justera mikroskopets fokus så att kontinuerlig visualisering bibehålls under exponeringen och håll transferpipettens spets i närheten så att snabb överflyttning mellan VS-dropparna säkerställs. Se figur 6.
9. Efter avslutad ekvibrering i ES, dra upp lite ES i transferpipetten och överför preparatet(n) med minimal volym från ES-droppen till VS-droppen och låt det(dem) ligga i 30 sekunder.
10. Ladda och värmeförsegla CryoTip på följande sätt (se figur 7a):
 - Skjut skyddshylsan av metall utmed CryoTip så att den fina, sköra spetsändan exponeras.
 - Hantera CryoTip och Hamilton-sprutan under observation under mikroskopet och aspirera omsorgsfullt en liten volym VS till markering 1 på CryoTip.
 - Fortsätt att observera förfarandet under mikroskopet och aspirera försiktigt preparatet med VS till markering 2 på CryoTip.
 - Lakta nu CryoTip direkt och aspirera mer VS till markering 3.

- Preparatet måste vara placerat mellan markering 2 och markering 3.
- Värmeförsegla (försegling 1) CryoTip vid (eller strax nedanför) markering 1 och för ned skyddshylsan igen så att den fina, sköra spetsen täcks och skyddas.
- Avlägsna försiktigt CryoTip från aspireringsinstrumentet och adaptern och värmeförsegla sedan (försegling 2) CryoTips breda ände ovanför markering 4.
- Sänk ned den täckta CryoTip direkt i flytande kväve (kylningshastighet på $-12\ 000\ ^\circ\text{C}/\text{min}$) (se figur 7b).

Ladda och försegla HSV-strået på följande sätt:

- Använd en mikropipett till att försiktigt deponera preparatet(n) i färan på kapillärröret 1 mm från änden. Droppen med preparatet(n) måste vara mindre än $0,5\ \mu\text{l}$. Högst 2 oocyter eller embryon per kapillärrör.
- Placera omedelbart kapillärröret och införingsenheten i strået och skjut in tills införingsenhetens rektangulära del är i kontakt med stråets utsvängda ände.
- Kläm strået lätt mellan tummen och pekfingeret och avlägsna införingsenheten.
- Håll strået på plats och försegla den öppna änden med en SYMS-försegelare.
- Håll strået med en pincett i området för hanteringsstaven.
- Sänk snabbt ned hela strået vertikalt i flytande kväve. Rör försiktigt runt strået i det flytande kvävet under några sekunder för att undvika att det bildas en isolerande luftbubbla runt strået.

Ladda Cryolock på följande sätt:

- Använd en mikropipett till att försiktigt ladda högst 2 preparat på spetsens konkava yta (sidan med Cryolock-logotypen) cirka 3 mm ($1/8\ \text{tum}$) från spetsens kant (använd det svarta märket som referens) och avlägsna eventuell överflödig kryoprotektant-lösning så att så liten volym vitrifieringslösning som möjligt lämnas kvar ($\leq 1\ \mu\text{l}$).
 - Alternativ A: För försiktigt in spetsen i locket genom att vrida ordentligt tills det sitter säkert, omedelbart innan Cryolock sänks ned i flytande kväve.
 - Alternativ B: Sänk omedelbart ned spetsen och locket under flytande kväve. Vänta tills bubblandet har upphört för att medge ekvilibriering. För försiktigt in spetsen i locket och vrid tillräckligt så att det sitter säkert.
ANM: Alternativ B är inte godkänt för användning i USA.
 - Sänk snabbt ned Cryolock i flytande kväve.
ANM: Förvara alltid Cryolock med locket vänt nedåt.
11. Placera det vitrifierade CryoTip, HSV-strået eller Cryolock i kryoröret eller koppen (på kryorörhållaren) nedsänkt i och fyllt med flytande kväve. Förslut kryoröret (eller koppen) eller sätt fast det upp-och-nedvänt med ett annat kryorör utan lock så att den vitrifierade enheten sitter stadigt i flytande kväve.
 12. Flytta behållaren med flytande kväve intill kryofrysens med flytande kväve och överför kryorörhållaren med innehåll till kryofrysens för långtidsförvaring.

B. EMBRYON (PN till blastocyst):

Vitrifieringsprotokoll:

1. Dispensera aseptiskt en $50\ \mu\text{l}$ -droppe ES på ett upp-och-nedvänt petriskållock.
2. Ta ut odlingsskålen med embryot(n) ur inkubatorn och kontrollera preparatets(-ens) kvalitet under mikroskop. Välj endast embryot(n) av bästa kvalitet för vitrifiering, när så är möjligt.
3. För omsorgsfullt över preparatet (högst två i taget) med en minimal volym medium från odlingsskålen till ES-droppen och starta tidtagaren.
Embryona ska ekvilibreras långsamt i ES-droppen genom fritt fall under 6–10 minuter.
Anm: Preparatet kommer att krympa och därefter successivt återgå till sin ursprungliga storlek, vilket anger att ekvilibreringen är fullbordad.
FÖRSIKTIGHET! Minimera exponering av preparatet(-en) för ljus under ekvilibriering i ES- och VS-dropparna.
4. Under denna ekvilibreringsperiod i ES:
 - Dispensera en $50\ \mu\text{l}$ -droppe VS-lösning så som visas i figur 8 och förbered CryoTip, HSV-strået eller Cryolock för laddning.

Följ protokollet enligt ovan (avsnitt A – Protokoll för vitrifiering av OOCYT (MI)) från steg 9 t.o.m. 12 för exponering för VS-lösningar, laddning av CryoTip, HSV-strå eller Cryolock, nedsänkning i flytande kväve och långtidsförvaring.

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 $2-8\ ^\circ\text{C}$. Vid förvaring enligt anvisningarna är Vitrification Freeze 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.

Som en extra försiktighetsåtgärd under förberedelsen rekommenderas att varje CryoTip undersöks noga när den tas ut ur förpackningen. CryoTips ska före användning undersökas i lämplig förstoring (40x) för eventuella skador (t.ex. brott på spetsarna eller sprickor) som kan ha uppstått under transporten.

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.

KASUTUSNÄIDUSTUSED

Vit Kit-Freeze on mõeldud kasutamiseks abistatud viljastamisprotseduurides inimese ootsüüride (MII), pronukleaarsete (PN) sügootide ning 3. päeva jagunemisaasis embrüote ja blastotsüsti faasis embrüote vitrifitseerimiseks ja säilitamiseks. See komplekt on mõeldud kasutamiseks koos CryoTipi (kataloogi nr 40709) ja komplektiga Vitricification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) proovide optimaalseks taastamiseks.

SEADME KIRJELDUS

Equilibration Solution-ES on HEPES-puhverdatud Medium-199 lahus, mis sisaldab gentamüsiinsulfaati, 7,5% (mahuprotsenti) nii DMSO-d kui ka etüleenglükooli ja 20% (mahuprotsenti) Dextran Serum Supplementi (DSS).

Vitrification Solution-VS on HEPES-puhverdatud Medium-199 lahus, mis sisaldab gentamüsiinsulfaati, 15% (mahuprotsenti) nii DMSO-d kui ka etüleenglükooli ning 20% (mahuprotsenti) DSS-i ja 0,5 M sahharoosi.

DSS on valgulisand, mis koosneb 50 mg/ml raviainena klassifitseeritud inimese seerumi albumiinist (HSA) ja 20 mg/ml dekstraanist. DSS-i kasutatakse kontsentratsioonis 20% (mahuprotsenti) tootes Vit Kit-Freeze, et saada lõppkontsentratsioon 10 mg/ml HSA-d ja 4 mg/ml dekstraani.

Neid kaht lahust tuleb kasutada järjest, samm-sammulise mikrotilk-vitrifitseerimisprotokolli kohaselt.

KOOSTIS

Soolad ja ioonid

Naatriumkloriid
Naatriumfosfaat
Kaaliiumkloriid
Magneesiumsulfaat
Naatriumatsetaat
Kaltsiumkloriid
Koliinkloriid
Raudnitraat

Puhver

Naatriumvesinikkarbonaat
HEPES

pH-indikaator

Fenoolpunane

Aminohapped

Arginiin
Glütsiin
Histidiin
Lüsiin

Proliin
Türosiin
Alaniin
Asparagiinhape
Glutamiinhape
Isoleutsiin
Leutsiin
Metioniin
Fenüülalaniin
Seriin
Treoniin
Trüptofaan
Valiin
Hüdroksüproliin
Tsüstiin
Tsüsteiin

Antioksiidant

Glutatioon

Muu

Adeniinsulfaat
Desoksüriboos
Riboos
Guaaniin
Uratsiil
Ksantiin
Tümiin
Hüpoksantiin
Adenosiin

Vitamiinid ja mineraalid

Kaltsiferool
Askorbiinhape
Aminobensoehape
Nikotiinhape
Nikotiinamiid
Pantoteenhape
Riboflaviin
Tiamiin
Biotiin

Püridoksiin
Naatriumbisulfit
Foolhape
Alfatokoferool

Antibiootikumid

Gentamüsiinsulfaat

Energia substraadid

Glükoos
Inositol

Valk

Inimese seerumi albumiin

Krükaitseaine

Dekstraan
Sahharoos
Etüleenglükool
Dimetüülsulfoksiid

Vesi

WFI kvaliteet

KVALITEEDI TAGAMINE

Vit Kit-Freeze'i lahused on membraanfiltreeritud ning töödeldud aseptiliselt valideeritud töötlemisprotsesside kohaselt.

Iga Vit Kit-Freeze'i partii läbib järgmised testid:

lahused ja CryoTipid.

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 soovi korral taotleda.

VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (katalooginr 40709) või HSV Straw (katalooginr 25246-25251) või Cryolock™ (katalooginr CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Connector (katalooginr 40736) või muu adapter
- Sterilised Petri tassid (50 X 9 mm, Falcon 351006 või samaväärsed)
- Krükatsutid (4,5 ml) või keeduklaasid ja krüopulgad
- Modifitseeritud HTF-HEPES (katalooginr 90126) sõode lisatud valguga
- Hüaluronidaas (katalooginr 90101)
- Ühekorrakindad
- Hamilton GASTIGHT® süstal (50 µl, katalooginr 80901) või muu aspireerimisvahend
- Ülekandepipetid (klaaspipetid või mikropipettotsakud, mille otsaku siseläbimõõt on ≥ 200 µm)
- Pintsetid või tangid
- Kilesulgur
- SYMS-sulgur HSV Straw jaoks

- 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))

KASUTUSJUHE

Vit Kit-Freeze'i komponendi nõuded (kasutuskorra kohta):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl ootsüütide vitritiseerimise protokollis jaoks
või
50 µl embrüo vitritiseerimise protokollis jaoks
- Vitrification Solution (VS):
50 µl vitritiseerimise protokollis kohta
- 1 CryoTip või HSV Straw või Cryolock (mahutab kuni 2 proovi)
- 1 liitmik

VITRITISEERIMISE PROTOKOLL:

MÄRKUS. Protseduuri tuleb teha toatemperatuuril (20–27 °C). ÄRGE kasutage järgmiste protseduuride tegemiseks soojendusega mikroskoobialust. ETTEVAATUST! ES-i ja VS-i lahuste tasakaalustamise ajal vähendage proovide kokkupuudet valgusega.

1. Laske kasutataval ES-i ja VS-i kogustel jõuda toatemperatuurile (20–27 °C). MÄRKUS. Kui vajate iga kord vaid osa lahust, siis ärge tooge terveid ES-i ja VS-i viaale korduvalt toatemperatuurile. Parem on kasutatav kogus alikvootida ja viaalid seejärel tagasi 2–8 °C temperatuurile viia. Ootsüütide vitritiseerimise protokollis jaoks on vajalik ka modifitseeritud HTP (HEPES) koos valguga.
2. Täitke vedela lämmastiku nõu vedela lämmastikuga (piisavalt, et seda oleks 4 tolli (10 cm) sügavuselt või niipalju, et krüokatsuti või -pulk oleks täielikult kaetud) ning asetage mikroskoobi lähedusse. Kinnitage krüokatsuti või keeduklaas (ilma korgita) krüopulga alumisse hoidikusse ning tõstke vedelasse lämmastikku, et valmistada see vitritiseeritud proovide hoidmiseks ette.
3. Määrake vitritiseeritavate proovide arv.
4. Sildistage iga steriilne Petri tass (või kaas) ja krüosaalitsvahend vajaliku teabega.
5. Keerake iga ES-i ja VS-i viaali õrnalt kaks korda ümber, et sisu enne kasutamist segada.
6. Valmistage tass lahustetilkadega vitritiseerimisprotseduuriks järgmiselt ette:

A. OOTSÜÜTIDE (MII) vitritiseerimise protseduur:

MÄRKUS 1. Kogutud ootsüüdid tuleb puhastada hüaluronidaasiga veendumaks, et tegu on MII-ga.

MÄRKUS 2. Embrüo vitritiseerimise protokollis vt lõigust B.

1. Kandke aseptilist tehnikat kasutades 20 µl tilgad söödet, modifitseeritud HTF-HEPES-t koos valguga ning ES-i üksteise lähedale steriilse Petri tassi tagurpidi kaanele, nagu on näidatud joonisel 1, ja asetage tass mikroskoobialusele:
 - üks 20 µl tilk modifitseeritud HTF-i (HEPES koos valguga)
 - kolm 20 µl tilka (kokku 60 µl) ES-i (ES1, ES2, ES3)
2. Eemaldage söötmest MII ootsüütidega inkubaatorist ja kontrollige proovide kvaliteeti mikroskoobi all. Kui on võimalik, valige üksnes parima kvaliteediga MII faasi ootsüüdid.
ETTEVAATUST! H-, ES- ja VS-tilkade tasakaalustamise ajal vähendage proovi(de) kokkupuudet valgusega.
3. Viige ootsüüt (kuni 2 tk korraga) koos minimaalse söötmehuga tassist (inkubaatoris) üheks minutiks 20 µl H-tilga sisse.
4. Ühendage H-tilk ülekandepipeti otsaku abil ES1-ga (vt joonis 1, nool 1) ning laske kahel lahusel 2 minuti jooksul spontaanselt seguneda.
5. Seejärel ühendage ES2 tilk (nool 2) varem ühendatud tilkadega ja laske 2 minutit seista.
6. Viige ootsüüt (ootsüüdid) koos minimaalse koguse lahusega segatud tilgast 6–10 minutiks ES3 tilga sisse. Märgus. Ootsüüdi (ootsüütide) tasakaalustamine ES3 sees on lõppenud, kui läbipaistva võõrme ja perivitelliinne ruumi paksus on võrdne. Ootsüüt (ootsüüdid) settivad 3 minutiga tilga põhja.
7. Tasakaalustamise ajal ES3-s.
Jaotage aseptiliselt üks (1) 50 µl tilk VS-i 2 minutit enne tasakaalustatuse saavutamist ning valmistage laadimiseks ette CryoTip (jn 3), HSV Straw (jn 4) või Cryolock (jn 5).
MÄRKUS. Vaadake vitritiseerimisvahend ja otsak enne protseduuri alustamist hoolikalt üle.
 - CryoTip: ühendage Hamiltoni süstla või aspireerimistööriista liitmiku või adapteri abil, et tagada õhutihedus. MÄRKUS. Hoidke metallist kattehülss peenikese otsaku peal, et kaitsa seda seni, kuni see on proovide laadimiseks valmis.
 - HSV Straw: ühendage sinise plastist sisestusseadme pikem ots käsitsemisvarda värvilisse otsa.
 - Cryolock: võtke kork maha.
8. Järgmised sammud (9–13) tuleb teha 80–110 sekundi jooksul. ETTEVAATUST! Proovide kokkupuudet VS-iga tuleb tsütotoksilisuse ärahoidmiseks piirata. Proov(id) kipuvad VS-is hõljuma, seepärast reguleerige mikroskoobi fookust, et säilitada kokkupuute ajal pidevat nähtavust, ning hoidke ülekandepipeti otsak käepärast, et tagada kiire VS-i tilkade vaheline üleviimine. Vt joonis 6.
9. Kui tasakaalustamine ES-is on lõppenud, siis tõmmake osa ES-ist ülekandepipeti sisse ja viige proov(id) minimaalse lisamahuga ES-i tilgast 30 sekundiks VS-i tilga sisse üle.
10. Laadige ja kuumsulgege CryoTip järgmiselt (vt joonis 7a).
 - Libistage metallist kattehülssi mööda CryoTipi üles, et paljastada peenike habras otsak.
 - CryoTipi ja Hamiltoni süstalt mikroskoobi all jälgides aspireerige ettevaatlikult väike kogus VS-i CryoTipi kuni tähistuseni 1.
 - Endiselt mikroskoobi all jälgides aspireerige proov õrnalt koos VS-iga CryoTipi kuni tähistuseni 2.

- Nüüd jälgige CryoTipi vahetult ja aspireerige rohkem VS-i tähistuseni 3.
- Proovid peavad jääma 2. ja 3. tähistuse vahele.
- Kuumsulgege (sulgemiskoht 1) CryoTip tähistuse 1 juures (või vahetult selle all) ning libistage kattehülss tagasi alla, et peent habrast otsa katta ja kaitsta.
- Eemaldage CryoTip ettevaatlikult aspireerimisvahendist ja adapterist ning kuumsulgege (sulgemiskoht 2) CryoTipi jämedamast otsast, tähistuse 4 kohalt.
- Laske kaetud CryoTip otse vedela lämmastiku sisse (jahutamiskiirus –12 000 °C/min) (vt joonis 7b).

Laadige ja sulgege HSV kõrs järgmiselt.

- Asetage proov(id) mikropipetiga kapillaartoru sisse, 1 mm otsast. Proov(e) sisaldav tilk peab olema alla 0,5 µl. Maksimaalselt 2 ootsüüti või embrüot iga kapillaartoru kohta.
- Asetage kapillaartoru ja käsitsemisvahend kõrre sisse ja suruge, kuni käsitsemisvahendi nelinurkne osa on kontaktis kõrre laienenud otsaga.
- Pigistage kõrt kergelt pöidla ja sõrmega ning eemaldage sisestusseade.
- Kõrt endiselt paigal hoides sulgege avatud ots SYMS-sulguriga.
- Hoidke kõrt pintsettidega käsitsemisvarda lähedal.
- Laske kogu kõrs kiirelt vertikaalselt LN₂ sisse. Segage kõrt õrnalt mõned sekundid LN₂ sees, et hoida ära isoleeriva õhumullikihi teke kõrre ümber.

Laadige Cryolock järgmiselt.

- Laadige mikropipetiga ettevaatlikult maksimaalselt 2 proovi otsaku nõgusale pinnale (Cryolocki logoga samale poolele) umbes 3 mm (1/8") otsaku servast (jälgige musta märgistust) ja eemaldage liigne krüokaitseaine, jättes vitrifikatsiooniatmet võimalikult väheses mahus (≤ 1 µl).
 - Variant A: vahetult enne Cryolocki sukeldamist LN₂ sisse sisestage otsak hoolikalt korgi sisse ja keerake kindlalt kinni.
 - Variant B: sukeldage otsak ja kork kohe LN₂ sisse. Oodake tasakaalustamise huvides, kuni mullitamine lõpeb. Sisestage otsak ettevaatlikult korgi sisse ja keerake piisavalt kindlalt kinni.
- MARKUS. Varianti B ei ole lubatud kasutada USA-s.
- Sukeldage Cryolock kiirelt vedellämmastiku sisse.
- MARKUS. Hoidke Cryolocki alati nii, et kork oleks allapoole.

11. Asetage vitrifitseeritud CryoTip, HSV kõrs või Cryolock sukeldatud, LN₂ täidetud krüoturusse või keedukaasi (krüopulga peal). Korkige krüokatsuti (või keedukaas) või kinnitage see tagurpidi teise korkimata krüokatsutiga, et vitrifitseerimisvahend vedelas lämmastikus paigal püsiks.
12. Tõstke LN₂ nõu LN₂ krüokülmuti lähedale ja viige krüopulk koos sisuga pikaajaliseks säilitamiseks üle krüokülmutisse.

B. EMBRÜOTE (PN – blastotsüst)

Vitrifitseerimise protokoll:

1. Jaotage aseptilist tehnikat kasutades üks 50 µl ES-i tilk Petri tassi tagurpidi kaanele.
2. Eemaldage söötmetass koos embrüo(te)ga inkubaatorist ja kontrollige proovide kvaliteeti mikroskoobi all. Kui võimalik, valige vitrifitseerimiseks üksnes parima kvaliteediga embrüo(d).
3. Viige proov (kuni 2 tk korraga) koos minimaalse söötmemahuga söötmetassilt üle ES-i tilga sisse ja käivitage taimer. Embrüod peavad ES-i tilga sees aeglaselt vabalangemise teel tasakaalustuma 6–10 minutit. Märkus. Proov tõmbub kokku ja taastab siis aeglaselt oma algsuure, mis näitab, et tasakaalustumine on lõppenud. ETTEVAATUST! ES-i ja VS-i tilkades tasakaalustamise ajal vähendage proovi(de) kokkupuudet valgusega.
4. Tasakaalustamise ajal ES-is:
 - asetage üks 50 µl VS-lahuse tilk nii, nagu on näidatud joonisel 8, ja valmistage laadimiseks ette CryoTip, HSV Straw või Cryolock.

Järgige ülaltoodud protokoll (osa A – ootsüütide [MI]) vitrifitseerimise protokoll) samme 9 kuni 12 VS-lahuste, CryoTipi, HSV Straw' või Cryolocki, LN₂ ja pikaajalise säilitamise kohta.

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 Freeze Kiti lahused stabiilsed kuni viaali etikettidel näidatud aegumiskuupäevani.

Ärge kasutage söödet üle kaheksa (8) nädala pärast anumate avamist.

Kuna tootes sisaldub inim pärilolu 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.

Lisaettevaatusabinõuna ettevalmistusprotseduuril soovime igat CryoTipi pakendist väljavõtmisel hoolikalt vaadelda. Enne kasutamist tuleb CryoTipi vaadelda sobiva suurendusega (40x), et tuvastada võimalikud kahjustused (nt otsa murdumine või mõrad), mis võivad olla tekkinud transpordi ajal.

Ärge kasutage lahuseviaali, milles on märgata kahjustusi, lekkeid, osakesi, hägusust või värvimuutusi. Kõrvaldage toode kooskõlas siseriikliku seadusandlusega.

Saastumise vältimiseks kasutatakse vahendeid aseptilist tehnikat kasutades.

Praegusel ajal näitab erialane kirjandus, et vitrifitseerimise pikaajalised 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 inimpäritoluga lähtematerjali on testitud USA Toidu- ja Ravimiameti (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 inimpäritoluga tooted on infektsioonivabad. Käidelda kõiki inimpäritoluga lähtematerjale nakkust edastada võiva materjalina ja rakendada üldisi ettevaatusabinõusid. Algmaterjali doonoreid on skriinitud ka CJD suhtes.

VASTUNÄIDUSTUS

Toode sisaldab gentamütsiinsulfaati. Tuleb rakendada sobivaid ettevaatusabinõusid veendumaks, et patsient ei ole selle antibiootikumi suhtes ülitundlik.

EU-FIGYELMEZTETÉS: Kizárólag professzionális felhasználásra.

FELHASZNÁLÁSI UTASÍTÁSOK

A Vit Kit-Freeze asszisztált reprodukciós eljárásokban való alkalmazásra szolgál, humán petesejtek (MI), pronukleáris (PN) zigótáktól 3 napos, barázdálódási szakaszban lévő embriók és blasztociszta stádiumban lévő embriók vitrifikációjához és tárolásához. Ezt a készletet CryoTippel (katalógusszám: 40709) és vitrifikációs olvasztási készletével (Vit Kit-Thaw) való használatra tervezték a minták optimális visszanyerése érdekében.

TERMÉKISMERTETÉS

Az **Equilibration Solution-ES** a Medium-199-nek egy HEPES-sel pufferelt oldata, amely gentamicin-szulfátot, 7,5-7,5% (v/v) DMSO-t és etilén-glikolt, valamint 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS) készítményt tartalmaz.

A **Vitrification Solution-VS** Medium-199-nek egy HEPES-sel pufferelt oldata, amely gentamicin-szulfátot, 15-15% (v/v) DMSO-t és etilén-glikolt, 20% (v/v) DSS-t és 0,5 M trehalózt tartalmaz.

A DSS egy fehérjekiegészítő készítmény, amely 50 mg/ml gyógyászati minőségű humán szérumalbuminból (HSA) és 20 mg/ml dextránból áll. A Vit Kit-Freeze oldat 20% (v/v) DSS-t tartalmaz, amely HSA esetében 10 mg/ml, dextrán esetében pedig 4 mg/ml végső koncentrációt jelent.

Ezt a két oldatot egymást követően kell alkalmazni a lépésekben végrehajtott microsepp-vitrifikációs protokollnak megfelelően.

ÖSSZETÉTEL

Sók és ionok

Nátrium-klorid
Nátrium-foszfát
Kálium-klorid
Magnézium-szulfát
Nátrium-acetát
Kalcium-klorid
Kolin-klorid
Vas-nitrát

Prolin
Tirozin
Alanin
Aszparaginsav
Glutaminsav
Izoleucin
Leucin
Metionin
Fenilalanin
Szerin

Puffer

Nátrium-bikarbonát
HEPES

pH-indikátor

Fenolvörös

Aminosavak

Arginin
Glicin
Hisztidin
Lizin

Treonin
Triptofán
Valin
Hidroxiprolin
Cisztin
Cisztein
Antioxidáns
Glutacion

Egyéb

Adenin-szulfát
Dezoxiribóz
Ribóz
Guanin
Uracil
Xantin
Timin
Hipoxantin
Adenozin

Vitaminok és ásványi

anyagok

Kalciferol
Aszkorbinsav
Aminobenzoesav
Nikotinsav
Nikotinsav-amid
Pantoténsav
Riboflavin
Tiamin

Biotin
Piridoxin
Nátrium-biszulfid
Folsav
Alfa-tokoferol

Antibiotikum

Gentamicin-szulfát

Energiaszubsztrátok

Glükóz
Inozitol

Fehérje

Humán szérumalbumin

Krioprotektáns

Dextrán
Szacharóz
Etilén-glikol
Dimetil-szulfoxid

Víz

Injekcióhoz való minőségű víz

MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

A Vit Kit-Freeze adatai membránszűrővel és aszeptikus technikával készültek, validált gyártási eljárások szerint.

A Vit Kit-Freeze minden egyes tételére elvégzik a következő teszteket:

Oldatok és CryoTípek.

Endotoxin limulus amöbocita lizátum (LAL) módszerrel ($\leq 0,6$ EU/ml);

Egér-embrió-assay (egysejtes) ($\geq 80\%$ kiterjesztett blasztociszta);

Sterilitás a jelenlegi Amerikai Gyógyszerkönyv <71> (Sikeres) sterilítási vizsgálatával.

Minden eredményről jelentés készül egy tételspecifikus analitikai bizonylaton, amely kérésre hozzáférhető.

SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ANYAGOK

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (katalógusszám: 40709) vagy HSV műszalma (katalógusszám: 25246-25251) vagy Cryolock™ (katalógusszám: CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC csatlakozó (katalógusszám: 40736) vagy más adapter
- Steril Petri-csészék (50 X 9 mm-es, Falcon 351006 vagy azzal egyenértékű)
- Kriocsövek (4,5 ml-es) vagy kelyhek és cryocane-ek
- Modified HTF – HEPES (katalógusszám: 90126) táptalaj fehérjével kiegészítve
- Hialuronidáz (katalógusszám: 90101)
- Eldobható kesztyűk
- Hamilton GASTIGHT® fecskendő (50 µl, katalógusszám: 80901) vagy más felszívóeszköz
- Transzferpipetták (húzott üveg pipetták vagy mikropipettahegyek, ~200 µm-es belső hegymérővel)
- Csipesz vagy fogó
- Impulzushegesztő
- SYMS lezáróegység a HSV-műszalmához

- Stopperóra vagy időzítő
- Folyékony nitrogénes tartály (dewar vagy polisztirolhab-tartály fedéllel, 1–2 l-es térfogat)
- Folyékony nitrogén (elegendő mennyiség a tartályban a 4 hüvelykes (10 cm) mélység eléréséhez)

HASZNÁLATI UTASÍTÁS

A Vit Kit-Freeze összetevőkre vonatkozó követelmények (alkalmazásonként):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl a petesejt-vitrifikációs protokollhoz
vagy
50 µl az embrióvitrifikációs protokollhoz
- Vitrification Solution (VS):
50 µl a vitrifikációs protokollhoz
- 1 CryoTip, HSV műszalma vagy Cryolock (legfeljebb 2 minta tárolásához)
- 1 csatlakozó

VITRIFIKÁCIÓS PROTOKOLL:

MEGJEGYZÉS: Az eljárásokat szobahőmérsékleten (20–27 °C) kell elvégezni. NE HASZNÁLJON melegített mikroszkóptárgyasztalt a következő eljárásokhoz. VIGYÁZAT! Az ES- és VS-oldatokban történő kiegyenlítés során minimalizálja a minta fénynek való kitettségét.

1. Az ES és a VS felhasználandó mennyiségének hőmérsékletét állítsa szoba-hőmérsékletűre (20–27 °C). **MEGJEGYZÉS:** Ne melegítse fel ismétleten szoba-hőmérsékletűre a teljes ES- és VS-fiólát, ha minden alkalommal csak egy része szükséges az oldatnak. Javasoljuk, hogy mérje ki a felhasználandó mennyiséget, és a kimérés után azonnal tegye vissza a fiólat 2–8 °C-ra. A petesejt-vitrifikációs protokollhoz a fehérjével kiegészített Modified HTF (HEPES) is szükséges.
2. Töltse fel a folyékony nitrogénes tartályt annyi folyékony nitrogénnel, amely elegendő a 4 hüvelykes (10 cm) mélység eléréséhez vagy a cryocane-en található kriocső teljes alámerítéséhez, és helyezze a mikroszkóp közelébe. Csatlakoztasson egy kriocsővet vagy (le nem zárt) kelyhet egy cryocane alsó fogójához, és merítse folyékony nitrogénbe a vitrifikált minták tárolásának előkészítéséhez.
3. Határozza meg a vitrifikálandó minták számát.
4. Címkezza fel az összes steril Petri-csészét (vagy fedelet) és krio tárolóeszközt a szükséges információkkal.
5. Óvatosan invertálja kétszer az egyes ES- és VS-fiólát a tartalmuk használat előtti összekeveréséhez.
6. Készítse elő az oldatcseppeket tartalmazó csészéket a vitrifikációs eljáráshoz az alábbiak szerint:

A. PETESEJT (MII) vitrifikációs protokollja:

1. MEGJEGYZÉS: A kinyert petesejteket hialuronidázzal le kell csupaszítani MII állapotuk megerősítése érdekében.

2. MEGJEGYZÉS: Az embrióvitrifikációs protokollt lásd a B szakaszban.

1. Aszeptikusan mérjen 20 µl-t a tápközegből, a fehérjével kiegészített Modified HTF – HEPES oldatból és az ES-ből egymáshoz közel egy steril Petri-csésze megfordított fedelére az 1. ábrán látható módon, majd helyezze a csészét a mikroszkóp tárgyasztalára:
 - egy 20 µl-es csepp Modified HTF (HEPES, fehérjével)
 - három 20 µl-es ES-csepp (ES1, ES2, ES3) (összesen 60 µl)
2. Vegye ki az MII petesejteket tartalmazó tenyésztőcsészét az inkubátorból, és mikroszkóp alatt ellenőrizze a minták minőségét. Ha lehetséges, csak a legjobb minőségű MII stádiumú petesejte(ke)t válassza ki. **VIGYÁZAT!** A H, ES- és VS-cseppekben történő kiegyenlítés során minimalizálja a minta (minták) fénynek való kitettségét. Helyezze át a petesejtet (egyszerre legfeljebb kettőt) minimális mennyiségű médiummal az (inkubátorban lévő) tenyésztőcsészéből a 20 µl-es H-cseppbe egy percre.
3. Egyesítse a H-cseppet az ES1-cseppel (lásd az 1. ábrán az 1. nyilat) a transzferpipetta hegyével, és hagyja 2 percig spontán keveredni a két oldatot.
4. Ezután egyesítse az ES2-cseppet (2. nyíl) a korábban egyesített cseppekkel, és hagyja 2 percig.
5. Helyezze át a petesejte(ke)t minimális mennyiségű oldattal az egyesített cseppből az ES3-cseppbe 6–10 percre. **Megjegyzés:** A petesejt(ek) ES3-ban történő kiegyenlítése akkor fejeződik be, amikor a zona pellucida és a perivitellinális tér vastagsága megegyezik. A petesejt (petesejtek) általában 3 percen belül a csepp alján helyezkedik (helyezkednek) el.
7. Az ES3-ban történő kiegyenlítés ideje alatt:
 - Aszeptikusan adagoljon egy (1) 50 µl-es VS-cseppet 2 perccel a teljes kiegyenlítés előtt, és készítse elő a CryoTipet (3. ábra), a HSV-műszalmát (4. ábra) vagy a Cryolockot (5. ábra) a betöltésre.

MEGJEGYZÉS: Az eljárás megkezdése előtt gondosan vizsgálja meg a vitrifikációs eszközt és a hegyet.

- CryoTip: csatlakoztassa Hamilton-fecskendőre vagy a megfelelő felszívóeszközre egy csatlakozó vagy adapter segítségével a szoros zárás érdekében. **MEGJEGYZÉS:** Hagyja a fém záróhengert a fínom végen annak védelme érdekében addig, amíg készen nem áll a minták betöltésére.
 - HSV-műszalma: csatlakoztassa a kék műanyag behelyezőeszköz hosszabb végét a fogantató színezett végére.
 - Cryolock: vegye le a kupakot.
8. A következő lépéseket (9–13. lépés) 80–110 másodperc alatt kell elvégezni. **VIGYÁZAT!** A minták VS-expozícióját korlátozni kell a citotoxicitás megakadályozása érdekében. A minták általában a VS tetején úsznak, ezért úgy állítsa be a fókuszát a mikroszkópon, hogy az expozíció során a vizualizáció folyamatosan legyen, és tartsa a transzferpipetta hegyét a közelben a VS-cseppek közötti gyors átvitel biztosítása érdekében. Lásd a 6. ábrát.
 9. Miután az ES-ben történő kiegyenlítés befejeződött, szívjon fel valamennyi ES-t a transzferpipettába, és vigye át a mintá(k)at minimális térfogattal az ES cseppjéből a VS-cseppbe 30 másodpercre.

10. Töltse fel és hegesztéssel zárja le a CryoTipet a következők szerint (lásd a 7a. ábrát):
 - Csúsztassa el a fém záróhengert a CryoTip mentén, hogy a finom, törékeny hegyű vég szabaddá váljon.
 - A CryoTipet és a Hamilton-fecskendőt kezelve, a mikroszkóp alatt figyelve óvatosan szívjon fel egy kis térfogatnyi VS-t a CryoTip-en lévő 1. jelig.
 - Folytassa a megfigyelést a mikroszkóp alatt, és óvatosan szívja fel a mintát VS-sel a CryoTipen lévő 2. jelig.
 - Most figyelje meg a CryoTipet közvetlenül, és szívjon fel több VS-t a 3. jelig.
 - A mintának a 2. és 3. jel között kell elhelyezkednie.
 - Hegesztéssel zárja le (1. lezárás) a CryoTipet az 1. jelnél (vagy csak épp alatta), és csúsztassa vissza a záróhengert, hogy eltakarja és védje a vékony, törékeny véget.
 - Óvatosan távolítsa el a CryoTipet a felszívóeszköztől és az adatterről, majd hegesztéssel zárja le (2. lezárás) a CryoTip vastag végét a 4. jel felett.
 - Merítse a befedett CryoTipet közvetlenül folyékony nitrogénbe (hűtés -12 000 °C/perc sebességgel) (lásd a 7b. ábrát). Töltse fel és zárja le a HSV-műszalmát a következők szerint:
 - Egy mikropipetta segítségével óvatosan tegye a mintá(ka)t a kapillárisrúd vajatába, 1 mm-re annak végétől. A mintá(ka)t tartalmazó cseppnek 0,5 µl-nél kevesebbnek kell lennie. Kapillárisrudaként legfeljebb 2 petesejt vagy embrió lehet.
 - Azonnal tegye a kapillárisrudat és a nyelet a műszalma kizélesztett végével.
 - Finoman szorítsa össze a mutató- és a hüvelykujjával a műszalmát, majd vegye ki a behelyezőeszközt.
 - A műszalma egy helyben tartása mellett zárja le a nyitott véget egy SYMS lezáróegység segítségével.
 - Tartsa be a műszalmát csipesszel a fogantyú közelében.
 - Gyorsan merítse függőlegesen a teljes műszalmát a folyékony nitrogénbe. Finoman keverje meg a műszalmát a folyékony nitrogénben néhány másodpercig, hogy elkerülje a műszalma körüli légbuborékréteg kialakulását.
 - Töltse be a Cryolockot az alábbiak szerint:
 - Egy mikropipetta segítségével óvatosan tegyen legfeljebb 2 mintát a hegy konkáv felületére (a Cryolock logó ugyanazon oldalára) körülbelül 3 mm-re (1/8 hüvelyk) a hegy végétől (használja referenciaként a fekete jelölést), és távolítsa el a felesleges védőoldatot úgy, hogy a lehető legkevesebb vitrificációs anyag maradjon ($\leq 1 \mu\text{l}$).
 - A. opció: A Cryolock folyékony nitrogénbe merítése előtt közvetlenül óvatosan szűrje a hegyet a kupakba finoman elfordítva, amíg biztosan nem rögzül.
 - B. opció: A hegyet és a kupakot azonnal merítse a folyékony nitrogénbe. A kiegyenlítés előtt várja meg a bugyogás leállását. Szűrje a hegyet a kupakba finoman elfordítva, amíg biztosan nem rögzül.
- MEGJEGYZÉS: A B. opció használata az Amerikai Egyesült Államokban nem jóváhagyott.
- Gyorsan merítse a Cryolockot folyékony nitrogénbe.
- MEGJEGYZÉS: A Cryolockot mindig a kupakkal lefelé tárolja.

B. EMBRIÓ (PN-től blasztocisztáig) vitrificációs protokollja:

1. Aszeptikusan adagoljon egy 50 µl-es ES-cseppet egy Petri-csésze felfordított fedelébe.
2. Vegye ki az embrió(ka)t tartalmazó tenyésztőcsészét az inkubátorból, és mikroszkóp alatt ellenőrizze a minta (minták) minőségét. Ha lehetséges, csak a legjobb minőségű embrió(ka)t válassza ki a vitrificációhoz.
3. Óvatosan helyezze át a mintát (egyszerre legfeljebb kettőt) minimális mennyiségű médiummal a tenyésztőcsészéből az ES-cseppbe, és indítsa el az időzítőt.
Az embrióknak az ES-cseppben lassan, szabadeséssel, 6–10 perc alatt kell egyensúlyba kerülniük.
Megjegyzés: A minta zsugorodni fog, majd fokozatosan visszanyeri az eredeti méretét, ami azt jelzi, hogy a kiegyenlítés befejeződött.
- VIGYÁZAT! Az ES- és VS-cseppekben történő kiegyenlítés során minimalizálja a minta (minták) fénynek való kitettségét.
4. Az ES-ben történő kiegyenlítés ideje alatt:
 - állítson össze egy 50 µl-es cseppet VS-oldatból a 8. ábrán látható módon, és készítse elő a CryoTipet, a HSV-műszalmát és a Cryolockot betöltésre.

Kövesse a fent ismertetett protokoll (A szakasz – Petesejt [MII] vitrificációs protokollja) 9–12. lépését a VS oldatoknak való kitettséghez, a CryoTip, a HSV műszalma és a Cryolock betöltéséhez, a folyékony nitrogénbe történő merítéshez és a hosszú távú tároláshoz.

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 botanlat fiolákat tárolja hűtve, 2 °C és 8 °C között. A Vitrification Freeze Kit oldatok 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 befolyásolnák 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.

Az előkészítési eljárás során további óvintézkedésként javasolt minden egyes CryoTip gondos megvizsgálása, amikor a csomagolásából kiveszik. Használat előtt a CryoTip eszközöket megfelelő nagyítás mellett (40x) kell vizsgálni a szállítás során esetleg bekövetkező károsodások miatt (ilyen lehet például a hegyek eltörése vagy megrepedése).

Ne használjon olyan oldatos fiólat, amely sérült, szivárog, részeszkék jelenlétét mutatja, esetleg zavaros, vagy megváltozott a színe. A terméket a vonatkozó előírásoknak megfelelően dobja ki.

A beszenyeződéssel járó problémák elkerülése érdekében aseptikus technikák alkalmazásával kezelje.

Jelenleg a kutatási szakirodalom szerint a vitrifikációnak 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 plazmapoolok 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. Ha Irvine Scientific, LLC Reproductive Media Products tenyésztőműdiumot adnak be egy betegnek, erősen javallott a termék nevét és tételszámát feljegyezni, hogy ismert maradjon a termék tételének és a betegnek a kapcsolata.

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK: Ez a termék humán szérumalbumint (HSA) tartalmaz. A termék előállítása során használt emberi eredetű anyag az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhivatala által hitelesített készülékekkel vizsgálva nem adott reakciót a hepatitisz 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 óvintézkedéseket. A donorokat Creutzfeldt-Jakob-kórra (CJD) is szűrték.

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 INDIKACIJOS

„Vit Kit-Freeze“ yra skirtas naudoti atliekant pagalbinio apvaisinimo procedūras, skirtas žmogaus kiaušialąsčių (MI), zigotų su probranduoliais (PN) 3 dienos skilimo stadijos embrionų ir blastocistos stadijos embrionų vitifikacijai ir laikymui. Šis kompleksas yra skirtas naudoti su „CryoTip“ (katalogo nr. 40709) ir vitifikacijos atšildymo rinkiniu („Vit Kit-Thaw“) siekiant optimaliai atkurti mėginius.

[TAISO APRAŠYMAS

Equilibration Solution-ES yra HEPES junginių buferintas terpės 199 tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato, po 7,5 % (v/v) dimetilsulfoksido (DMSO) ir etilenglikolio bei 20 % (v/v) dekstrano serumo priedo (DSS).

Vitification Solution-VS yra HEPES junginių buferintas terpės 199 tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato, po 15 % (v/v) dimetilsulfoksido (DMSO) ir etilenglikolio bei 20 % (v/v) DSS ir 0,5 M sacharozės.

DSS yra baltyminis papildas, kurį sudaro 50 mg/ml terapinės paskirties žmogaus serumo albumino (ŽSA) ir 20 mg/ml dekstrano. „Vit Kit-Freeze“ DSS yra naudojamas 20 % (v/v) koncentracijos, kad būtų gauta galutinė 10 mg/ml ŽSA ir 4 mg/ml dekstrano koncentracija.

Šie du tirpalai bus naudojami sekoje pagal nuoseklų mikrolašų vitifikacijos protokolą.

SUDĖTIS

Druskos ir jonai

Natrio chloridas

Natrio fosfatas

Kalio chloridas

Magnio sulfatas

Natrio acetatas

Kalcio chloridas

Cholino chloridas

Geležies nitratas

Buferinis tirpalas

Natrio bikarbonatas

HEPES

pH indikatorius

Fenolio raudonas

Aminorūgštys

Argininas

Glicinas

Histidinas

Lizinas

Prolinas

Tirozinas

Alaninas

Asparto rūgštis

Glutamo rūgštis

Izoleucinas

Leucinas

Metioninas

Fenilalaninas

Serinas

Treoninas

Triptofanas

Valinas

Hidroksiprolinas

Cistinas

Cisteinas

Antioksidantas

Glutonas

Kita

Adenino sulfatas

Deoksiribozę

Ribozę

Guaninas

Uracilas

Ksantinas

Timinas

Hipoksantinas

Adenozinas

Vitaminai ir mineralai

Kalciferolis

Askorbo rūgštis

Aminobenzoinė rūgštis

Nikotino rūgštis

Nikotino rūgšties amidas

Pantotėninė rūgštis

Riboflavinas

Tiaminas

Biotinas

Piridoksinas

Natrio bisulfatas

Folio rūgštis

Alfa tokoferolis

Antibiotikai

Gentamicino sulfatas

Energetiniai substratai

Glukozę

Inozitolis

Baltymas

Žmogaus serumo albuminas

Krioprotektinė medžiaga

Dekstranas

Sacharozė

Etilenglikolis

Dimetilsulfoksidas

Vanduo

Injekcinio vandens kokybė

KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

„Vit Kit-Freeze“ tirpalai yra filtruoti naudojant membraninį filtrą ir apdoroti steriliomis sąlygomis pagal patvirtintus gamybos procesus.

„Vit Kit-Freeze“ kiekvienai partijai atliekami šie testai:

Tirpalai ir „CryoTips“.

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.

REIKALINGOS, BET NEPATEIKIAMOS PRIEMONĖS

- „Irvine Scientific LLC“, „CryoTip“ (katalogo nr. 40709) arba „HSV Straw“ (katalogo nr. 25246-25251) ar „Cryolock™“ (katalogo nr. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- „Irvine Scientific LLC“ jungtis (katalogo nr. 40736) arba kitas adapteris
- Sterilios petri lėkštelės (50 X 9 mm, „Falcon 351006“ arba analogiškos)
- Kriogeniniai mėgintuvėliai (4,5 ml) arba taurės ir kriogeniniai laikikliai
- „Modified HTF - HEPES“ (katalogo nr. 90126) mitybinė terpė papildyta baltymu
- Hialuronidazė (katalogo nr. 90101)
- Vienkartinės pirštinės
- „Hamilton GASTIGHT®“ švirkštas (50 μ l, katalogo nr. 80901) arba kita siurbimo priemonė
- Perkėlimo pipetės (stiklo pipetės arba mikropipetę antgaliai, kurių vidinis skersmuo ~200 μ m)
- Pincetas ar žnyplės
- Impulsinis užlydymo aparatas
- SYMS sandarinimo aparatas, skirtas „HSV Straw“

- Chronometras arba laikmatis
- Skystojo azoto indas (duaro arba polistirolu talpyklė su dangteliu, 1–2 l tūris)
- Skystasis azotas (pakankamas tūris 4 colių (10 cm) gyliui pasiekti talpyklėje)

NAUDOJIMO NURODYMAI

„Vit Kit-Freeze“ komponentų reikalavimai (naudojimui):

- Pusiausvirinimo tirpalas (ES):
60 µl oocitų vitrifikacijos protokolui
arba
50 µl embriono vitrifikacijos protokolui
- Vitrifikacijos tirpalas (VS):
50 µl vitrifikacijos protokolui
- 1 „CryoTip“ ar „HSV Straw“ arba „Cryolock“ (galima saugoti ne daugiau kaip 2 mėginius)
- 1 jungtis

VITRIFIKACIJOS PROTOKOLAS

PASTABA. Procedūras reikia atlikti kambario temperatūroje (20–27 °C). Šioms procedūroms NENAUDOKITE šildomo mikroskopo stalo. PERSPĖJIMAS. Nustatovint ES ir VS tirpaluose minimaliai sumažinkite šviesos poveikį bandiniui.

1. Naudojamą ES ir VS kiekį sušildykite iki kambario temperatūros (20–27 °C). **PASTABA.** Stenkitės pakartotinai nesusildyti visų ES ir VS flakonų iki kambario temperatūros, kai kaskart reikia tik dalies tirpalo. Geriau paimti naudojamą kiekį ir po paėmimo iškart grąžinti flakonui į 2–8 °C temperatūrą. Oocitų vitrifikacijos protokolui taip pat reikia „Modified HTF“ (HEPES) su baltymu.
2. Pripildykite skystojo azoto talpyklę skystojo azoto (tik, kad būtų pasiektas 4 colių (10 cm) gylis arba galėtumėte visiškai panardinti kriogeninį mėgintuvėlį ant laikiklio) ir padėkite netoli mikroskopo. Pritvirtinkite kriogeninį mėgintuvėlį arba taurę (neuždengtą) prie kriogeninio laikiklio apatinio gnybto ir panardinkite į skystąjį azotą paruošdami laikyti vitrifikuotus bandinius.
3. Nustatykite norimų vitrifikuoti bandinių skaičių.
4. Pažymėkite ant kiekvieno sterilios petri lėkštelės (ar dangtelio) ir kriogeninio saugojimo įrenginio reikalingą informaciją.
5. Prieš naudodami švelniai du kartus pavartykite kiekvieną ES ir VS flakoną, kad sumaišytumėte jų turinį.
6. Lėkštelę su tirpalu lašeliais vitrifikacijos procedūrai paruoškite taip:

A. OOCITŲ (MII) vitrifikacijos protokolai

1 PASTABA. Paimti oocitai bus atidengti hialuronidaze, siekiant patvirtinti, kad jie yra MII.

2 PASTABA. Embrionų vitrifikacijos protokolą rasite B skyriuje.

1. Steriliai užlašinkite 20 µl mitybinės terpės, „Modified HTF“ su baltymu ir ES lašą arti vienas kito ant apversto sterilios petri lėkštelės dangtelio, kaip parodyta 1 pav., ir padėkite lėkštelę ant mikroskopo stalo:
 - vienas 20 µl „Modified HTF“ (HEPES su baltymu) lašas;
 - trys 20 µl (iš viso 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3) lašai.
2. Išimkite pasėlio lėkštelę, kurioje yra MII oocitai, iš inkubatoriaus ir po mikroskopu patikrinkite bandinių kokybę. Jeigu galima, rinkitės tik geriausios kokybės MII stadijos oocitą (-us).

PERSPĖJIMAS. Nustatovint H, ES ir VS lašeliuose minimaliai sumažinkite šviesos poveikį bandiniui (-iams).

3. Perkelkite oocitą (iki 2 vienu metu) su minimaliu kiekiu terpės iš pasėlio lėkštelės (inkubatoriuje) į 20 µl H lašą vienai minutei.
4. Perkėlimo pipetės antgaliu suliekit H lašą su ES1 (žr. 1 pav., 1 rodyklę) ir leiskite dviem tirpalams savaime susimaišyti 2 minutes.
5. Tada įlašinkite ES2 lašą (2 rodyklę) į anksčiau sulietus lašus ir palikite 2 minutėms.
6. Perkelkite oocitą (-us) su minimaliu tirpalo kiekiu iš sulieto lašo į ES3 lašą 6–10 minučių. **Pastaba:** oocito (-ų) nusistovėjimas ES3 yra užbaigtas, kai skaidriojo apvalkalo ir perivitelinės ertmės tarpo storis yra lygus. Oocitas (-ai) nusės į lašo apačią per 3 minutes.
7. Nustatovint ES3:

Steriliai paimkite vieną (1) 50 µl VS 2 lašą prieš baigiant nusistovėti ir paruoškite „CryoTip“ (3 pav.), „HSV Straw“ (4 pav.) arba „Cryolock“ (5 pav.) įdėti:

PASTABA. Prieš pradėdami procedūrą, atidžiai patikrinkite vitrifikavimo prietaisą ir antgalį

- „CryoTip“: naudodami jungtį ar adapterį, prijunkite prie Hamiltono švirkšto arba atitinkamos siurbimo priemonės, kad būtų užtikrintas sandarumas. **PASTABA.** Laikykite metalinę šiaudelio movą ant plonojo galiuko, kad jį apsaugotumėte, kol pasiruošite įdėti mėginį.
 - „HSV Straw“: prijunkite mėlyno plastikinio įvedimo įtaiso ilgesnįjį galą prie tvarkymo stropo spalvoto galo.
 - „Cryolock“: nuimkite dangtelį.
8. Šiuos veiksmus (9–13) reikia atlikti per 80–110 sekundžių. **PERSPĖJIMAS.** VS poveikis bandiniams turi būti ribotas, kad būtų apsaugota nuo citotoksiškumo. Bandinys (-iai) linkęs (-ę) plūduriuoti VS, todėl pakoreguokite centrą per mikroskopą, kad nuolat galėtumėte stebėti poveikį, šalia turėkite perkėlimo pipetės antgalį, kad galėtumėte garantuoti greitą perkėlimą tarp VS lašelių. Žr. 6 pav.
 9. Baigę pusiausvirinimą ES, įtraukite šiek tiek ES į perkėlimo pipetę ir perkelkite minimalaus tūrio bandinį (-ius) iš ES lašo į VS lašą 30 sekundžių.
 10. Įdėkite ir užlydykite „CryoTip“, kaip nurodyta toliau (žr. 7a pav.).
 - Nuslinkite metalinę šiaudelio movą aukštyr per „CryoTip“, kad atvertumėte plonąjį trapų galiuką.
 - Laikydami „CryoTip“ ir Hamiltono švirkštą po mikroskopu, atsargiai įtraukite mažą VS tūrį iki 1-os žymos ant „CryoTip“.
 - Toliau stebėkite mikroskopu ir švelniai įtraukite bandinio su VS iki 2-os žymos ant „CryoTip“.
 - Dabar stebėkite „CryoTip“ tiesiogiai ir įtraukite dar VS iki 3-ios žymos.

- Bandinys turi būti tarp 2-os ir 3-ios žymų.
- Užlydykite (1-as sandariklis) „CryoTip“ ties (arba šiek tiek žemiau) 1-a žyma ir nuslinkite dengiamąją movą atgal, kad uždengtų ir apsaugotų plonąjį trapų galiuką.
- Atsargiai išimkite „CryoTip“ iš siurbimo priemonės ir adapterio, o tada užlydykite (2-as sandariklis) „CryoTip“ storajame gale, virš 4-os žymos.
- Panardinkite uždengtą „CryoTip“ tiesiai į skystąjį azotą (vėsindami –12 000 °C/min. sparta) (žr. 7b pav.).

Įdėkite ir užsandarinkite „HSV straw“ taip:

- Mikropipete atsargiai padėkite bandinį (-ius) į kapiliarinio vamzdelio lataką 1 mm nuo galo. Lašelį, kuriame yra bandinys (-iai), turi būti mažesnis kaip 0,5 µl. Kiekviename kapiliariniame vamzdyje gali būti ne daugiau kaip 2 oocitai ar embrionai.
- Nedelsdami įdėkite kapiliarinį vamzdelį ir perkėlimo įtaisą į šiaudelį ir stumkite, kol staciakampė perkėlimo įtaiso dalis palies išplatėjusį šiaudelio galą.
- Nestipriai suspauskite šiaudelį tarp nykščio ir smiliaus ir išimkite įvedimo įtaisą.
- Prilaikydami šiaudelį vietoje, užsandarinkite atvirą galą, naudodami SYMS sandarinimo įtaisą.
- Žnyplėmis laikykite šiaudelį tvarkymo strypo srityje.
- Greitai panardinkite visą šiaudelį į LN₂ vertikaloje padėtyje. Kelias sekundes švelniai pamašykite šiaudelį LN₂, kad aplink šiaudelį nesusidarytų atskiriantis oro burbuliukų sluoksnis.

Įdėkite „Cryolock“ taip:

- Mikropipete atsargiai įdėkite ne daugiau kaip 2 mėginius ant antgalio išgaubto paviršiaus (toje pačioje pusėje, kur „Cryolock“ logotipas) maždaug 3 mm (1/8") nuo antgalio krašto (kaip orientyrą naudokite juodą žymą), pašalindami nereikalingą krioapsauginį tirpalą ir palikdami kuo mažiau vitrifikacijos terpės (≤ 1 µl).
- A variantas: nedelsdami ir prieš panardindami „Cryolock“ į LN₂, atsargiai įkiškite antgalį į dangtelį ir sandariai uždarykite.
- B variantas: nedelsdami panardinkite antgalį į dangtelį į LN₂. Palaukite, kol nustos burbuliuoti, kad galėtų nusistovėti. Atsargiai įkiškite antgalį į dangtelį, tvirtai užsukite.
- PASTABA. B varianto negalima naudoti JAV.
- Greitai panardinkite „Cryolock“ į skystąjį azotą.
- PASTABA. Visada „Cryolock“ laikykite taip, kad dangtelis būtų nukreiptas žemyn.

11. Sudėkite vitrifikuotą „CryoTip“, HSV šiaudelį ar „Cryolock“ į panardintą LN₂ pripildytą kriogeninį mėgintuvėlį arba taurę (ant kriogeninio laikiklio). Uždėkite ant kriogeninio mėgintuvėlio (ar taurės) dangtelį arba pritvirtinkite apverstą prie kito neuždengto kriogeninio mėgintuvėlio, kad galėtumėte uždaryti vitrifikuotą prietaisą skystajame azote.
12. Perkelkite LN₂ talpyklę arti LN₂ kriošaldiklio kriogeninį laikiklį su visu turiniu į kriošaldiklį ilgalaikiam saugojimui.

B. EMBRIONAI (nuo PN iki blastocistos)

Vitrifikacijos protokolas

1. Steriliai užlašinkite vieną 50 µl ES lašą ant petri lėkštelės apversto dangtelio.
2. Išimkite pasėlio lėkštelę, kurioje yra embrionas (-ai), iš inkubatoriaus ir po mikroskopo patikrinkite bandinio (-ių) kokybę. Jeigu galima, vitrifikuoti rinkitės tik geriausios kokybės embrioną (-us).
3. Atsargiai perkelkite bandinį (iki dviejų vienu metu) su minimaliu terpės kiekiu iš pasėlio lėkštelės į ES lašą ir paleiskite laikmatį.
Embrionai turi lėtai nusistovėti ES laše laisvu kritimu 6–10 minučių.
Pastaba. Bandinys susitrauks ir po to palaipsniui grįš iki savo pradinio dydžio, tai reikš, kad nusistovėjimas yra baigtas.
PERSPĖJIMAS. Nusistovint ES ir VS lašeliuose minimaliai sumažinkite šviesos poveikį bandiniui (-iams).
4. Nusistovint ES:
 - užlašinkite vieną 50 µl VS tirpalo lašą, kaip parodyta 8 pav., ir paruoškite „CryoTip“, „HSV Straw“ arba „Cryolock“ įdėjimui.

Laikykites protokolo, kaip nurodyta pirmiau (A skyrius). Oocito [MI] vitrifikacijos protokolas nuo 9 iki 12 veiksmų dėl VS tirpalo poveikio, „CryoTip“, „HSV Straw“ ar „Cryolock“ įdėjimo, panardinimo LN₂ ir ilgalaikio saugojimo.

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 flakonų laikykite atvėsintus 2–8 °C temperatūroje. Kai laikomi taip, kaip nurodyta, „Vitrification Freeze“ tirpalai išlieka stabilūs iki ant flakono etiketės nurodytos galiojimo pabaigos datos.

Atidarę talpykles, terpės 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.

Papildomai apsisaugant paruošiamosios procedūros metu rekomenduojame išėmus iš pakuotės kiekvieną „Cryotip“ atidžiai apžiūrėti. Prieš naudojant „CryoTip“ produktus reikia apžiūrėti taikant tinkamą objekto padidinimą (40 k. stiprumo), ar nesimato pažeidimų (pvz., galiukų lūžių ar įskilimų), kurie galėjo atsirasti gabenimo metu.

Negalima naudoti jokio tirpalo flakono, jei yra pažeidimų, nutękis, 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 atitinkančią albuminą, pagamintą taikant patvirtintus apdorojimo metodus. Primygtinai 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 imunodeficit 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 Krocifeldo-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 ENDİKASYONLARI

Vit Kit-Freeze ürününün yardımcı üreme işlemlerinde gün 3 klivaj evresi embriyolar ve blastokist evresi embriyolara kadar pronükleer (PN7) zigotlar ve insan oositlerinin (MI) vitrifikasyonu ve saklanması amaçlanmıştır. Bu kit CryoTip (Katalog no 40709) ve Vitrification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) ile numunelerin optimum geri kazanımı için kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

CİHAZ TANIMI

Equilibration Solution-ES, gentamisin sülfat, %7,5 (h/h) DMSO ve etilen glikol (her biri) ve %20 (h/h) Dekstran Serum Takviyesi (DSS) içeren bir HEPES tamponlu Medium-199 solüsyonudur.

Vitrification Solution-VS, gentamisin sülfat, %15 (h/h) DMSO ve etilen glikol (her biri), %20 (h/h) DSS ve 0,5 M sükröz 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-Freeze içinde %20 (h/h) değerinde kullanılır.

Bu iki solüsyon kademeli mikrodamlı vitrifikasyon protokolüne göre sırayla kullanılacaktır.

BİLEŞİM

Tuzlar ve İyonlar

Sodyum Klorür
Sodyum Fosfat
Potasyum Klorür
Magnezyum Sülfat
Sodyum Asetat
Kalsiyum Klorür
Kolin Klorür
Ferrik Nitrat

Tampon

Sodyum Bikarbonat
HEPES

pH Göstergesi

Fenol Kırmızısı

Amino Asitler

Arjinin
Glisin
Histidin
Lizin

Prolin

Tirozin

Alanin

Aspartik Asit

Glutamik Asit

İzöloşin

Lösin

Metiyonin

Fenilalanin

Serin

Treonin

Triptofan

Valin

Hidroksiprolin

Sistin

Sistein

Antioksidan

Glutasyon

Diğer

Adenin Sülfat

Deoksiriboz

Riboz

Guanin

Urasil

Ksantin

Timin

Hipoksantin

Adenozin

Vitaminler ve Mineraller

Kalsiferol

Askorbik Asit

Aminobenzoik Asit

Nikotinik Asit

Nikotinik Asit Amid

Pantotenik Asit

Riboflavin

Tiyamin

Biyotin

Piridoksin

Sodyum Bisülfat

Folik Asit

Alfa Tokoferol

Antibiyotikler

Gentamisin Sülfat

Enerji Substratları

Glukoz

İnositol

Protein

İnsan Serum Albumini

Kriyokoruyucu

Dekstran

Sükröz

Etilen Glikol

Dimetilsülfoksit

Su

Enjeksiyonluk Su Kalitesi

KALİTE GÜVENCE

Vit Kit-Freeze içindeki solüsyonlar doğrulanmış üretim işlemlerine göre membrandan filtrelenmiş ve aseptik olarak işlenmiştir.

Her Vit Kit-Freeze lotu şu testlerden geçer:

Solüsyonlar ve CryoTip'ler.

Limulus Amebosit Lizat (LAL) metodolojisi ile endotoksin ($\leq 0,6$ EU/mL)

Fare Embriyo Testi (tek hücre) (≥ 80 genişlemiş blastokist)

Mevcut USP Sterilite Testi <71> ile sterilite (Geçti)

Tüm sonuçlar istek üzerine sağlanabilecek, lota spesifik bir Analiz Sertifikasında bildirilir.

GEREKLİ AMA DAHİL EDİLMİYEN MATERYAL

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (Katalog no 40709) veya HSV Straw (Katalog no 25246-25251) veya Cryolock™ (Katalog no CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Konektörü (Katalog no 40736) veya diğer adaptör
- Steril petri tabakları (50 X 9 mm, Falcon 351006 veya eşdeğeri)
- Kriyotüpler (4,5 mL) veya gobletler ve cryocane ürünleri
- Modified HTF - HEPES (Katalog no 90126) kültür vasatı, proteinle takviye edilmiş
- Hyaluronidase (Katalog no 90101)
- Tek kullanımlık eldivenler
- Hamilton GASTIGHT® Şırıngası (50 µL, Katalog no 80901) veya başka aspirasyon aracı
- Transfer pipetleri (iç uç çapı ~200 µm olan çekme cam pipetler veya mikropipet uçları)
- Cımbız veya forseps
- Darbeli Isı Mühürleyici
- HSV Straw için SYMS Mühürleyici
- 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)

KULLANMA TALİMATI

Vit Kit-Freeze bileşen gereklilikleri (uygulama başına):

- Equilibration Solution (ES):
60 µL, Oosit Vitrifikasyonu Protokolü için
Veya
50 µL, Embriyo Vitrifikasyonu Protokolü için
- Vitrification Solution (VS):
50 µL, Vitrifikasyon Protokolü için
- 1 CryoTip veya HSV Straw veya Cryolock (2 adede kadar numune saklar)
- 1 Konektör

VİTRİFİKASYON PROTOKOLÜ:

NOT: İşlemler oda sıcaklığında (20°C - 27°C) yapılacaktır. Aşağıdaki işlemler için ısıtılmış mikroskop tablasını KULLANMAYIN. DİKKAT: ES ve VS solüsyonlarında dengelenme sırasında numunenin ışığa maruz kalmasını en aza indirin.

1. Kullanılacak ES ve VS miktarını oda sıcaklığına (20°C - 27°C) getirin. NOT: Her seferinde solüsyonun bir kısmı gerektiğinde tüm ES ve VS 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. Oosit vitrifikasyon protokolü için proteinli Modified HTF (HEPES) gereklidir.
2. Sıvı nitrojen rezervuarını sıvı nitrojen ile doldurun (4 inç (10 cm) derinlik elde edecek veya çubuk üzerindeki kriyotüp tamamen batırmaya yetecek bir derinliğe kadar) ve mikroskobun yakınına yerleştirin. Bir cryocane alt klempine bir kriyotüp veya goblet (kapaksız) takın ve vitrifiye numunelerin saklanması için hazırlık olarak sıvı nitrojene batırın.
3. Vitrifiye edilecek numune sayısını belirleyin.
4. Her steril petri tabağı (veya kapağı) ve kriyosaklama cihazını gerekli bilgilerle etiketleyin.
5. Kullanım öncesinde içeriği karıştırmak için her ES ve VS flakonunu iki kez yavaşça ters düz edin.
6. Vitrifikasyon işlemi için solüsyon damlaları içeren tabağı şu şekilde hazırlayın:

A. OOSİT (MII) Vitrifikasyonu Protokolü:

NOT 1: Alınan oositler, MII olduklarını doğrulamak üzere Hyaluronidase ile soyulacaktır.

NOT 2: Embriyo vitrifikasyonu protokolü için bakınız Bölüm B.

1. Şekil 1'de gösterildiği gibi steril petri tabağının ters çevrilmiş kapağına 20 µL kültür vasatı, proteinli Modified HTF - HEPES ve ES damlalarını birbirine çok yakın olarak aseptik teknikle koyun ve tabağı mikroskop tablasına yerleştirin:
 - bir 20 µL Modified HTF (proteinli HEPES) damlası
 - üç 20 µL damla (toplam 60 µL) ES (ES1, ES2, ES3)
2. İnkübatörden MII oositlerini içeren kültür tabağını alın ve mikroskop altında numunelerin kalitesini kontrol edin. Mümkünse sadece en iyi kaliteye sahip MII evresi oositi/oositleri seçin. DİKKAT: H, ES ve VS damlalarında dengelenme sırasında numunenin/numunelerin ışığa maruz kalmasını en aza indirin.
3. Oositi (her seferinde iki adede kadar olmak üzere) minimum vasat hacmiyle kültür tabağından (inkübatörde) 20 µL H damlasına bir dakikalığına aktarın.
4. Transfer pipetinin ucunu H ile ES1 damlasını birleştirin (Bakınız Şekil 1, ok 1) ve 2 dakika boyunca iki solüsyonun kendiliğinden karışmasını bekleyin.
5. Sonra ES2 damlasını (ok 2) daha önce birleştirilmiş damlalarla birleştirin ve 2 dakika böyle bırakın.
6. Oosit/oositleri birleştirilmiş damladan ES3 damlasına minimum solüsyon hacmiyle 6-10 dakikalığına aktarın. Not: zona pellusida ve perivitellin boşluk kalınlığı eşit olduğunda oositin/oositlerin ES3 içinde dengelenmesi tamamlanmıştır. Oosit/oositler 3 dakika içinde damlanın dibine çökecektir.
7. ES3 içinde dengelenme zamanı sırasında:
Tam dengelenmeden 2 dakika önce aseptik olarak bir (1) 50 µL VS damlası koyun ve CryoTip (Şekil 3), HSV Straw (Şekil 4) veya Cryolock (Şekil 5) cihazını yükleme için hazırlayın:
NOT: İşleme başlamadan önce vitrifikasyon cihazını ve ucunu dikkatle inceleyin
 - CryoTip: sıkı bir mühür oluşturmak üzere bir konektör veya adaptör kullanarak Hamilton şırıngası veya uygun aspirasyon aracına bağlayın. NOT: Numuneleri yüklemeye hazır oluncaya kadar korumak için örtme kılıfını ince çekme uç üzerinde tutun.
 - HSV Straw: Mavi plastik insersiyon cihazının uzun ucunu muamele çubuğunun renkli ucuna takın.
 - Cryolock: kapağı ayırın.
8. Aşağıdaki adımlar (9-13) 80-110 saniye içinde tamamlanmalıdır. DİKKAT: Sitotoksisiteyi önlemek için numunelerin VS'ye maruz kalması sınırlanmalıdır. Numune/numuneler VS'de yüzmeye eğiliminde olduğundan mikroskobun odağını, maruz bırakma sırasında sürekli görüntüleme sağlayacak şekilde ayarlayın ve VS damlaları arasında hızlı aktarmayı sağlamak üzere transfer pipetinin ucunu yakın tutun. Bakınız Şekil 6.
9. ES içinde dengelenme tamamlandıktan sonra transfer pipetine biraz ES çekin ve numuneyi/numuneleri minimum hacimle ES damlasından VS damlası içine 30 saniyelikliğine aktarın.
10. CryoTip cihazını şu şekilde yükleyin ve ısıyla mühürleyin (Bakınız Şekil 7a):
 - İnce narin uçlu son kısmı açığa çıkarmak için metal örtme kılıfını CryoTip boyunca yukarı kaydırın.
 - Mikroskop altında izlerken CryoTip ve Hamilton şırıngasını kullanarak CryoTip cihazında İşaret no 1'e kadar küçük bir VS hacmini dikkatle aspire edin.
 - Mikroskop altında izlemeye devam edin ve VS ile numuneyi CryoTip kısmında İşaret no 2'ye kadar yavaşça aspire edin.
 - Şimdi CryoTip cihazını doğrudan izleyin ve İşaret no 3'e kadar daha fazla VS aspirasyonu yapın.
 - Numune, İşaret no 2 ile İşaret No 3 arasında yer almalıdır.

- CryoTip cihazını İşaret no 1 üzerinde (veya hemen altında) ısıyla mühürleyin (Mühür No 1) ve ince narin ucu örtmek ve korumak üzere örtme kılıfını geriye doğru kaydırın.
- CryoTip cihazını aspirasyon aracı ve adaptörden dikkatle çıkarın ve sonra CryoTip kalın ucunu İşaret no 4 üzerinde ısıyla mühürleyin (Mühür no 2).
- Örtülü CryoTip cihazını doğrudan sıvı nitrojene batırın ($-12000^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızında soğutma) (Bakınız Şekil 7b).

HSV straw cihazını şu şekilde yükleyin ve mühürleyin:

- Bir mikropipet kullanarak numuneyi/numuneleri kapiller çubuğun oluşuna uçtan 1 mm mesafede dikkatle koyun. Numunenin/numunelerin bulunduğu damla 0,5 μL altında olmalıdır. Her kapiller çubuk için maksimum 2 oosit veya embriyo.
- Kapiller çubuğu ve insersiyon cihazını hemen kamışın yerleştirin ve insersiyon çubuğunun dikdörtgen kısmı kamışın genişleyen ucuna temas edinceye kadar itin.
- Kamışı başparmağınız ve parmağınız arasında hafifçe tutun ve insersiyon cihazını çıkarın.
- Kamışı yerinde tutmaya devam ederken açık ucu bir SYMS mühürleyici kullanarak mühürleyin.
- Kamışı muamele çubuğu alanında cımbız kullanarak tutun.
- Tüm kamışı dikey olarak LN_2 içine hızla batırın. Kamış etrafında yalıtıcı bir hava kabarcığı tabakası oluşmasından kaçınmak için kamışı LN_2 içinde birkaç saniye boyunca yavaşça çevirin.

Cryolock cihazını şu şekilde yükleyin:

- Bir mikropipet kullanarak ve mümkün olduğunca minimum bir vitrifikasyon ortamı hacmi ($\leq 1 \mu\text{L}$) bırakmak üzere herhangi bir fazla kriyokoruyucu çözümü gidererek ucun konkav yüzeyine (Cryolock logosuyla aynı taraf) ucun kenarından (referans olarak siyah çizgiyi kullanan) yaklaşık 3 mm (1/8 inç) mesafeye maksimum iki adet numuneyi dikkatle yükleyin.
 - Seçenek A: Hemen ve Cryolock cihazı LN_2 içine batırılmadan önce ucu kapak içine dikkatle yerleştirin ve sağlam oturuncaya kadar sıkıca çevirin
 - Seçenek B: Hemen uç ve kapağı LN_2 içine batırın. Dengelenmeye izin verecek şekilde kabarcık oluşmasının durmasını bekleyin. Ucu dikkatle kapağa yerleştirin ve sağlam oturuncaya kadar sıkıca çevirin.
- NOT: Seçenek B, ABD'de kullanım için onaylı değildir.
- Cryolock cihazını hızla sıvı nitrojene batırın.
- NOT: Cryolock cihazını daima kapak aşağı bakacak şekilde saklayın.

11. Vitrifiye CryoTip, HSV straw veya Cryolock ürününü LN_2 doldurulmuş batırılmış kriyotüp veya goblete (cryocane üzerinde) yerleştirin. Vitrifiye cihazı sıvı nitrojenle sabitlemek için kriyotüp (veya goblet) kapağını kapatın veya başka bir kapaksız kriyotüple birlikte ters olarak tutturun.
12. LN_2 rezervuarını LN_2 kriyodondurucusuna yaklaştırın ve cryocane cihazını içindekilerle birlikte uzun dönemli saklama için kriyodondurucuya aktarın.

B. EMBRİYOLAR (PN'den Blastokiste):

Vitrifikasyon Protokolü:

1. Bir petri tabağının ters çevrilmiş kapağına aseptik olarak bir 50 μL ES damlası koyun.
2. İnkübatörden embriyoyu/embriyoları içeren kültür tabağını alın ve mikroskop altında numunenin/numunelerin kalitesini kontrol edin. Mümkünse vitrifikasyon için sadece en iyi kaliteye sahip embriyoyu/embriyoları seçin.
3. Numuneyi (her seferinde iki adede kadar olmak üzere) minimum vasat hacmiyle birlikte kültür tabağından ES damlasına dikkatle aktarın ve zamanlayıcıyı başlatın.
Embriyolar ES damlası içinde serbest düşme yoluyla 6-10 dakika dengelenmelidir.
Not: Numune küçülüp sonra giderek orijinal büyüklüğüne dönecektir ve bu durum dengelenmenin tamamlandığına işaret eder.
DİKKAT: ES ve VS damlalarında dengelenme sırasında numunenin/numunelerin ışığa maruz kalmasını en aza indirin.
4. ES içinde bu dengelenme zamanı sırasında:
 - Şekil 8'de gösterildiği gibi bir 50 μL VS çözümü damlası hazırlayın ve CryoTip, HSV Straw veya Cryolock cihazını yükleme için hazırlayın.

VS solüsyonlarına maruz bırakma, CryoTip, HSV Straw veya Cryolock yüklenmesi, LN_2 'ye batırma ve uzun dönemli saklama için adım 9 ile 12 arasında protokolü yukarıda yazıldığı şekilde izleyin (Bölüm A - Oosit [MII] Vitrifikasyonu Protokolü).

Bu ürünlerin kullanımı hakkında ek ayrıntılar için her laboratuvar kendi tıbbi programına göre özellikle geliştirilmiş ve optimize edilmiş kendi laboratuvar işlemleri ve protokollerine başvurmaktadır.

SAKLAMA TALİMATI VE STABİLİTE

Açılmamış flakonları 2°C ile 8°C arasında buzdolabında saklayın. Talimattaki gibi saklandığında Vitrification Freeze 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.

Hazırlama işlemi sırasında ek bir önlem olarak her Cryotip cihazının ambalajdan çıkarıldığında dikkatle incelenmesini öneririz. Kullanım öncesinde CryoTip cihazları transfer sırasında oluşmuş olabilecek olası hasar (uç kırılmaları veya çatlamaları gibi) açısından uygun büyütmeye (40x büyütmeye) altında incelenmelidir.

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 şişeyi 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. Yerleşmiş süreçlerle Avrupa Farmakopesi 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 (İSA) içerir. Bu ürünün üretilmesinde kullanılan insan kaynaklı materyal FDA lisanslı kitlerle 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 kullanarak ve enfeksiyon bulaştırabilirliği gibi kullanın. Kaynak materyal donörleri CJD için de taranmıştır.

KONTRENDİKASYON

Ürün Gentamisin Sülfat içerir. Hastanın bu antibiyotığa karşı hassas olmadığından emin olmak için gerekli önlemler alınmalıdır.

UPOZORNENIE V EÚ: Len na profesionálne použitie.

INDIKÁCIE NA POUŽITIE

Súprava Vit Kit-Freeze je určená na použitie pri postupoch asistovanej reprodukcie na vitifikáciu a uchovávanie ľudských oocytov (MII), pronukleárných (PN) zygot až po 3-dňové embryá v štádiu ryhovania a embryí v štádiu blastocysty. Táto súprava je určená na použitie s kryošpičkou (katalógové č. 40709) a súpravou Vitricification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) na optimálny odber vzoriek.

POPIS ZARIADENIA

Equilibration Solution-ES je HEPES-pufrovaný roztok média 199, obsahujúceho gentamicínsulfát, po 7,5 % (v/v) DMSO aj etylénglykolu, a 20 % (v/v) doplnku so sérovým dextranom (DSS).

Vitrification Solution-VS je HEPES-pufrovaný roztok média 199, obsahujúceho gentamicínsulfát, po 15 % (v/v) DMSO aj etylénglykolu, 20 % (v/v) DSS a 0,5 M sacharózy.

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-Freeze na výslednú koncentráciu 10 mg/ml HSA a 4 mg/ml dextranu.

Tieto dva roztoky sa musia používať v poradí určenom protokolom na postupnú vitifikáciu mikrovapiek.

ZLOŽENIE

Soli a ióny

chlorid sodný
fosfát sodný
chlorid draselný
sírán horečnatý
octan sodný
chlorid vápenatý
cholín vápenatý
dusičan železitý

Pufer

hydrogénuhlíčan sodný
HEPES

Indikátor pH

fenolová červeň

Aminokyseliny

arginín
glycín
histidín
lyzín

prolín

tyrozín

alanín

kyselina asparágová

kyselina glutámová

izoleucín

leucín

metionín

fenylalanín

serín

treonín

tryptofán

valín

hydroxyprolín

cystín

cysteín

Antioxidant

glutatión

Iné

adenín sulfát

deoxyribóza

ribóza

guanín

uracil

xantín

tymín

hypoxantín

adenozín

Vitamíny a minerály

kalciferol

kyselina askorbová

kyselina aminobenzoová

kyselina nikotínová

amid kyseliny nikotínovej

kyselina pantoténová

riboflavín

tiámín

biotín

pyridoxín

hydrogénsiričitan sodný

kyselina listová

alfa-tokoferol

Antibiotiká

gentamicínsulfát

Energetické substráty

glukóza

inositol

Bielkoviny

ľudský sérový albumín

Kryoprotektant

dextran

sacharóza

etylénglykol

dimetylsulfoxid

Voda

kvalita vody na injekciu

KONTROLA KVALITY

Roztoky v súprave Vit Kit-Freeze sú filtrované cez membránu a asepticky spracované podľa výrobných postupov, ktoré boli overené.

Každá šarža Vit Kit-Freeze prešla nasledujúcimi skúškami:

Roztoky a kryošpičky

endotoxín pomocou testu amébocytového lyzátu z ostrorépa 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.

VÝŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Kryošpička Irvine Scientific, LLC CryoTip (katalógové č. 40709) alebo HSV Straw (katalógové č. 25246-25251) alebo Cryolock™ (katalógové č. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC konektor (katalógové č. 40736) alebo iný adaptér
- Sterilné Petriho misky (50 × 9 mm, Falcon 351006 alebo ekvivalentné)
- Kryoskúmavky (4,5 ml) alebo poháriky alebo kryotyčinky
- Kultivačné médium Modified HTF – HEPES (katalógové č. 90126) doplnené o bielkoviny
- Hyaluronidáza (katalógové č. 90101)
- Jednorazové rukavice
- Striekačka Hamilton GASTIGHT® (50 μ l, katalógové č. 80901) alebo iný aspiračný nástroj
- Prenosové pipety (pipety z ľahného skla alebo špičky mikropipet s vnútorným priemerom špičky ~200 μ m)
- Pinzeta alebo kliešťky
- Impulzné tepelné pečatidlo
- Pečatidlo SYMS pre slamku HSV Straw
- 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)

NÁVOD NA POUŽITIE

Požiadavky na časti súpravy Vit Kit-Freeze (na jednu aplikáciu):

- Roztok Equilibration Solution (ES):
60 µl na vitrificačný protokol pre oocyty alebo
50 µl na vitrificačný protokol pre embryá
- Roztok Vitrification Solution (VS):
50 µl na vitrificačný protokol
- 1 kryšpíčka alebo slamka HSV Straw alebo zariadenie Cryolock (uchováva maximálne 2 vzorky)
- 1 konektor

VITRIFIKAČNÝ PROTOKOL:

POZNÁMKA: Postupy sa musia vykonávať pri izbovej teplote (20 °C – 27 °C). Na nasledujúce postupy NEPOUŽÍVAJTE zahriaty stolík mikroskopu. **UPOZORNENIE:** Počas ustálenia v roztokoch ES a VS minimalizujte expozíciu vzorky svetlu.

1. Množstvo roztokov ES a VS, ktoré sa má použiť, vytemperujte na izbovú teplotu (20 °C – 27 °C). **POZNÁMKA:** Celé skúmavky s roztokmi ES a VS opakovane netemperujte na izbovú teplotu, keď je zakaždým potrebná len časť roztoku. Je lepšie alikvotovať množstvo, ktoré sa má použiť, a skúmavky vrátiť do teploty 2 °C – 8 °C hneď po alikvotovaní. Na vitrificačný protokol pre oocyty je tiež potrebné médium Modified HTF (HEPES) s bielkovinami.
2. Zásobník tekutého dusíka naplňte tekutým dusíkom (dostatočným množstvom, aby sa dosiahla hĺbka 4 palce (10 cm) alebo na úplné ponorenie kryoskúmavky na tyčinke) a položte ho do blízkosti mikroskopu. Mikroskúmavku alebo pohárík (bez vrchnáka) pripievňte k spodnej svorke kryotyčinky a ponorte ho do tekutého dusíka v rámci prípravy na uchovávanie vitrifikovaných vzoriek.
3. Stanovte počet vzoriek, ktoré sa idú vitrifikovať.
4. Každú sterilnú Petriho misku (alebo vrchnák) a zariadenie na kryochovávanie označte potrebnými informáciami.
5. Každú skúmavku s roztokmi TS a VS pred použitím dvakrát jemne preklepte, aby sa premiešal obsah.
6. Pripravte misku s kvapkami roztokov na vitrificačný postup nasledovným spôsobom:

A. Vitrificačný protokol pre OOCYTY (MI):

POZNÁMKA 1: Získané oocyty sa obnažia hyaluronidázou na potvrdenie, že sú MI.

POZNÁMKA 2: Vitrificačný protokol pre embryá nájdete v časti B.

1. Asepticky nadávkujte 20 µl kvapku kultivačného média Modified HTF – HEPES s bielkovinami a roztoku ES do tesnej blízkosti na prevrátený vrchnák sterilnej Petriho misky tak, ako je ukázané na obrázku 1, a misku položte na stolík mikroskopu:
 - jednu 20 µl kvapku média Modified HTF (HEPES s bielkovinami)
 - tri 20 µl kvapky (60 µl celkom) roztoku ES (ES1, ES2, ES3)
2. Kultivačnú misku obsahujúcu MI oocyty vyberte z inkubátora a pod mikroskopom skontrolujte kvalitu vzoriek. Podľa možnosti vyberte len najkvalitnejšie oocyty v štádiu MI.
UPOZORNENIE: Počas ustálenia v kvapkách H, ES a VS minimalizujte expozíciu vzorky svetlu.
3. Oocyt preneste (maximálne po 2 odrazu) s minimálnym množstvom média z kultivačnej misky (v inkubátore) do 20 µl kvapky roztoku H na jednu minútu.
4. Kvapky roztokov H a ES1 (pozri obrázok 1, šípka 1) spojte špičkou prenosovej pipety a nechajte, aby sa tieto dva roztoky spontánne miešali 2 minúty.
5. Potom spojte kvapku roztoku ES2 (šípka 2) s už predtým spojenými kvapkami a nechajte postáť 2 minúty.
6. Oocyt preneste s minimálnym množstvom roztoku zo spojenej kvapky do kvapky ES3 na 6 – 10 minút. **Poznámka:** ustálenie oocytov v ES3 je kompletne, keď sa hrúbka zona pellucida vyrovná s perivitelinným priestorom. Oocyt usadnú na dno kvapky do 3 minút.
7. Počas doby ustálenia v ES3:
Dve minúty pred úplným ustálením asepticky nadávkujte jednu (1) 50 µl kvapku roztoku VS a pripravte kryšpíčku (obrázok 3), slamku HSV Straw (obrázok 4) alebo zariadenie Cryolock (obrázok 5) na naplnenie:
POZNÁMKA: Skôr, než začnete postup, pozorne prezrite vitrificačné zariadenie a špičku.
 - Kryšpíčka: Pomocou konektora alebo adaptéra pripojte Hamiltonovu striekačku alebo vhodný aspiračný nástroj, aby sa vytvorilo pevné utesnenie. **POZNÁMKA:** Kovové krycie puzdro ponechajte na jemnej vytiahnutej špičke na ochranu dovtedy, kým nie je pripravená na naplnenie vzoriek.
 - Slamka HSV Straw: dlhší koniec modrého plastového zasuvacieho zariadenia spojte s farebným koncom manipulačnej tyčinky.
 - Zariadenie Cryolock: zložte uzáver.
8. Nasledujúce kroky (9 – 13) je potrebné vykonať za 80 – 110 sekúnd. **UPOZORNENIE:** Vystavenie vzoriek roztoku VS by sa malo obmedziť, aby sa zabránilo cytotoxicite. Vzorky majú tendenciu vznášať sa v roztoku VS, takže prispôbte zaostrenie mikroskopu tak, aby sa zabezpečilo kontinuálne zobrazenie počas expozície, a špičku prenosovej pipety držte v blízkosti, aby sa zaistil rýchly prenos medzi kvapkami VS. Pozri obrázok 6.
9. Po dokončení ustálenia v roztoku ES natiahnite trochu ES do prenosovej pipety a vzorku s minimálnym objemom preneste z kvapky ES do kvapky VS na 30 sekúnd.
10. Naplňte a tepelne zapečatíte kryšpíčky nasledujúcim spôsobom (pozri obrázok 7a):
 - Kovové krycie puzdro posuňte nahor spolu s kryšpíčkou, aby sa obnažil krehký koniec jemnej špičky.
 - Manipulujte s kryšpíčkou a Hamiltonovou striekačkou za pozorovania pod mikroskopom a opatrne aspirujte malý objem roztoku VS po značku č. 1 na kryšpíčke.
 - Pokračujte v pozorovaní pod mikroskopom a jemne aspirujte vzorku s roztokom VS po značku č. 2 na kryšpíčke.

- Teraz pozorujte kryošpičku priamo a aspirujte ešte viac roztoku VS po značku č. 3.
- Vzorka sa musí nachádzať medzi značkou č. 2 a značkou č. 3.
- Tepelne zapečatíte (pečať č. 1) kryošpičku na značke č. 1 (alebo tesne pod ňou) a krycie puzdro posuňte nadol, aby zakrylo a chránilo jemnú krehkú špičku.
- Opatrne vyberte kryošpičku z aspiračného nástroja a adaptér a potom tepelne zapečatíte (pečať č. 2) na hrubom konci kryošpičky nad značkou č. 4.
- Krytú kryošpičku ponorte priamo do tekutého dusíka (chladiaceho rýchlosťou $-12\,000\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) (pozri obrázok 7b).

Slamky HSV Straw naplňte a zapečatíte nasledovným spôsobom:

- Mikropipetou opatrne vložte vzorky do kanálka na kapilárnej tyčinke 1 mm od konca. Kvapka obsahujúca vzorky musí byť menšia než $0.5\text{ }\mu\text{l}$. V každej kapilárnej tyčinke môžu byť maximálne 2 oocyty alebo embryá.
- Kapilárnu tyčinku a manipulátor okamžite vložte do slamky a zatlačajte, kým sa obdĺžniková časť manipulátora nedostane do kontaktu s rozšíreným koncom slamky.
- Slamku jemne stisnite medzi palcom a prstom a vyberte zasúvacie zariadenie.
- Slamku držte na mieste a zároveň zapečatíte otvorený koniec pečatidlom SYMS.
- Slamku držte pinzetou v oblasti manipulačnej tyčinky.
- Celú slamku rýchlo vertikálne ponorte do LN_2 . Tyčinkou jemne miešajte LN_2 niekoľko sekúnd, aby sa okolo slamky nevytvorila izolujúca vrstva vzduchových bublín.

Zariadenie Cryolock naplňte nasledujúcim spôsobom:

- Mikropipetou opatrne naložte maximálne 2 vzorky na konkávny povrch špičky (na tej istej strane ako logo Cryolock) približne 3 mm (1/8 palca) od okraja špičky (na referenciu použite čiernu značku) a odstráňte všetok nadbytočný kryoprotekčný roztok, čím sa zanechá len čo najminimálnejší objem vitrifikáčného média ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$).
- Možnosť A: Ihneď a pred ponorením zariadenia Cryolock do LN_2 opatrne vložte špičku do uzáveru otáčaním, kým nebude pevne držať.
- Možnosť B: Ihneď ponorte špičku a uzáver do LN_2 . Počkajte, kým sa prestanú tvoriť bubliny, aby sa umožnilo ustálenie. Do uzáveru opatrne vložte špičku otáčaním, pokiaľ nebude pevne držať.
- POZNÁMKA: Možnosť B nie je schválená na použitie v USA.
- Rýchlo ponorte zariadenie Cryolock do tekutého dusíka.
- POZNÁMKA: Zariadenie Cryolock uchovávajte vždy uzáverom nadol.

11. Vitrifikovanú kryošpičku, slamku HSV alebo zariadenie Cryolock umiestnite do ponorenej, kryoskúmavky alebo pohárika naplneného LN_2 (na kryotyčinke). Kryoskúmavku (alebo pohárik) zatvorte alebo pripevnite hore dnom k inej nezatvorenej kryoskúmavke, aby sa vitrifikované zariadenie zaistilo v tekutom dusíku.
12. Zásobník LN_2 presuňte bližšie ku kryomrazničke LN_2 a kryotyčinku s obsahom preneste do kryomrazničky na dlhodobé uchovávanie.

B. EMBRYÁ (PN až blastocysta):

Vitrifikačný protokol:

1. Asepticky nadávajte jednu $50\text{ }\mu\text{l}$ kvapku roztoku ES na prevrátený vrchnák Petriho misky.
2. Kultivačnú misku s embryami vyberte z inkubátora a pod mikroskopom skontrolujte kvalitu vzorky. Podľa možnosti vyberte len najkvalitnejšie embryá na vitrifikáciu.
3. Vzorku opatrne preneste (maximálne po dve odrazy) s minimálnym množstvom média z kultivačnej misky do kvapky roztoku ES a zapnite časovač.
Embryá by sa mali ustáliť v kvapke ES pomaly voľným pádom po dobu 6 – 10 minút.
Poznámka: Vzorka sa scvrkne a potom sa postupne vráti na pôvodnú veľkosť, čo označí dokončenie ustálenia.
UPOZORNENIE: Počas ustálenia v kvapkách ES a VS minimalizujte expozíciu vzorky svetlu.
4. Počas tejto doby ustálenia v ES:
 - pripravte jednu $50\text{ }\mu\text{l}$ kvapku roztoku VS ako je zobrazené na obrázku 8 a pripravte kryošpičku, slamku HSV alebo zariadenie Cryolock na plnenie.

Postupujte podľa vyššie uvedeného protokolu (Časť A – Vitrifikačný protokol pre oocyty [MI]) od kroku 9 po krok 12, kde nájdete vystavenie roztokom VS, plnenie kryošpičky, slamky HSV alebo zariadenia Cryolock, ponorenie do LN_2 a dlhodobé uchovávanie.

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 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri odporúčanom skladovaní budú roztoky súpravy Vitrification Freeze 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 uchovávanía sa môžu vytvoriť určité tuhé častice. O týchto tuhých časticách nie je známe, že by mali vplyv na výkon produktu.

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA

Táto pomôcka je určená na výhradné použitie personálom vyškoleným 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.

Ako prídavné ochranné opatrenie pri prípravnom postupe odporúčame, aby bola každá kryošpička pozorne prezretá pri vyberaní z balenia. Pred použitím je potrebné kryošpičky prezrieť pod vhodným zväčšením (sily 40 x), či nedošlo k poškodeniu (ako napríklad zlomené alebo prasknuté špičky), ktoré mohlo vzniknúť počas prepravy.

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 pacientovi podávajú kultivačné médiá produktov reprodukčných médií spoločnosti Irvine Scientific, LLC, sa zaznamená názov a číslo šarže produktu, aby sa zachovalo prepojenie medzi pacientom 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.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ЗА ЕС: Само за професионална употреба.

ПОКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Vit Kit-Freeze е предназначен за употреба при асистиран репродуктивни процедури за витрификация и съхранение на човешки яйцеклетки (MI), пронуклеарни (PN) зиготи чрез ембриони в ден 3 на стадия на делене и ембриони в стадия на бластоцист. Този комплект е проектиран за употреба с CryoTip (каталожен № 40709) и витрификационния комплект за размразяване (Vit Kit-Thaw) за оптимално възстановяване на спесиментите.

ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

Equilibration Solution-ES е буферен разтвор с HEPES на Medium-199, съдържащ гентамицин сулфат, по 7,5% (v/v) DMSO и етилен гликол и 20% (v/v) серумен суплемент с декстран (DSS).

Vitrification Solution-VS е буферен разтвор с HEPES на Medium-199, съдържащ гентамицин сулфат, по 15% (v/v) DMSO и етилен гликол и 20% (v/v) серумен суплемент с декстран (DSS) и 0,5 M захароза.

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-Freeze за окончателна концентрация от 10 mg/mL HSA и 4 mg/mL декстран.

Тези два разтвора трябва да се използват последователно в съответствие с протокола за поетапна микрокапкова витрификация.

СЪСТАВ

Соли и йони

Натриев хлорид
Натриев фосфат
Калиев хлорид
Магнезиев сулфат
Натриев ацетат
Калциев хлорид
Холин хлорид
Железен нитрат

Пролин
Тирозин
Аланин
Аспаргинова киселина
Глутаминова киселина
Изолевцин
Левцин
Метионин
Фенилаланин

Други

Аденин сулфат
Дезоксирибоза
Рибоза
Гуанин
Урацил
Ксантин
Тимин
Хипоксантин
Аденозин

Биотин
Пиридоксин
Натриев бисулфит
Фолиева киселина
Алфа-токоферол

Буфер

Сода бикарбонат
HEPES

Индикатор за рН

Червен фенол

Аминокиселини

Аргинин
Глицин
Хистидин
Лизин

Серин
Треонин
Триптофан
Валин
Хидроксиполин
Цистин
Цистеин

Антиоксидант

Глутатион

Витамини и минерали

Калциферол
Аскорбинова киселина
Аминобензоена киселина
Никотинова киселина
Амид на никотинова киселина
Пантотенова киселина
Рибофлавин
Тиамин

Антибиотици

Гентамицин сулфат

Енергийни субстрати

Глюкоза
Инозитол

Протеин

Човешки серумен албумин

Криопротектор

Декстран
Сукроза
Етилен гликол
Диметил сулфоксид

Вода

WFI качество

ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО

Разтворите във Vit Kit-Freeze са мембранно филтрирани и асептично обработени съгласно валидираните производствените процедури.

Всяка партида Vit Kit-Freeze преминава през следните изпитвания:

Разтвори и CryoTips.

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.

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ВКЛЮЧЕНИ

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (каталожен № 40709) или тръбичка HSV (каталожен № 25246-25251), или Cryolock™ (каталожен № CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Конектор Irvine Scientific, LLC (каталожен № 40736) или друг адаптер
- Стерилни петриевы блюда (50 X 9 mm, Falcon 351006 или еквивалентни)
- Криотуби (4,5 mL), бокали или криопръчки
- Хранителна среда с модифициран HTF-HEPES (каталожен № 90126), допълнена с протеин
- Хиалуронидаза (каталожен № 90101)
- Ръкавици за еднократна употреба
- Спринцовка Hamilton GASTIGHT® (50 µL, каталожен № 80901) или друг аспирационен инструмент
- Трансфериращи пипети (пипети със стъкло бутало или микропипетни върхове с вътрешен диаметър на върха ~200 µm)
- Пинцети или форцепс
- Импулсен топлинен уплътнител
- Уплътнител SYMS за тръбичка HSV

- 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).

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Изисквания за компонентите на Vit Kit-Freeze (за всяко приложение):

- Equilibration Solution (ES):
60 µL за протокола за витрификация на яйцеклетки или
50 µL за протокола за витрификация на ембриони
- Vitrification Solution (VS):
50 µL за протокола за витрификация
- 1 CryoTip, тръбичка HSV или Cryolock (съхранява до 2 спесимена)
- 1 конектор.

ПРОТОКОЛ ЗА ВИТРИФИКАЦИЯ:

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 еквилибрирането в разтвори ES и VS сведете до минимум излагането на спесимена на светлина.

1. Затоплете количеството ES и VS, което ще използвате, до стайна температура (20 – 27° C). **ЗАБЕЛЕЖКА:** Когато всеки път се налага да използвате само част от разтвора, избягвайте да затопляте целите епруветки с ES и VS 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 отделянето. За протокола за витрификация на яйцеклетки е необходим също така и модифициран HTF (HEPES) с протеин.
2. Налейте течен азот в резервоара (достатъчно за постигане на дълбочина от 4 инча (10 cm) или за пълно потапяне на криотубата или криопръчката) и го поставете близо до микроскопа. Прикрепете криотуба или бокал (незатворен) към долната скоба на криопръчка и потопете в течния азот за подготовка за съхранение на витрифицираните спесимени.
3. Определете броя на спесимените, които ще бъдат витрифицирани.
4. Поставете етикет с необходимата информация на всяко стерилно петриево блюдо (или капак) и изделие за криосъхранение.
5. Внимателно обърнете всяка епруветка с ES и VS два пъти, за да смесите съдържанието преди употреба.
6. Подгответе блюдото с капки разтвор за процедурата за витрификация, както следва:

A. Протокол за витрификация на ЯЙЦЕКЛЕТКИ (MII):

ЗАБЕЛЕЖКА 1: Извлечените яйцеклетки трябва да бъдат оголени с хиалуронидаза, за да се потвърди, че са MII.

ЗАБЕЛЕЖКА 2: Вижте раздел B за информация относно протокола за витрификация на ембриони.

1. Капнете асептично капка 20 µL хранителна среда, модифициран HTF-HEPES с протеин и ES в непосредствена близост до обърнат капак на стерилно петриево блюдо, както е показано на Фигура 1, и поставете блюдото на стойката на микроскопа:
 - Една капка 20 µL модифициран HTF (HEPES с протеин)
 - Три капки от по 20 µL (общо 60 µL) ES (ES1, ES2, ES3).
2. Извадете блюдото за култивиране, съдържащо яйцеклетки MII, от инкубатора и проверете качеството на спесимените под микроскоп. Когато е възможно, изберете само яйцеклетката/яйцеклетките в MII стадий с най-добро качество. **ВНИМАНИЕ:** По време на еквилибрирането в капки H, ES и VS сведете до минимум излагането на спесимена/спесимените на светлина.
3. Прехвърлете яйцеклетките (до 2 наведнъж) с минимално количество от средата от блюдото за култивиране (в инкубатор) в капка 20 µL H за една минута.
4. Смесете капката H с ES1 (вж. Фигура 1, стрелка 1) с върха на трансфериращата пипета и изчакайте 2 минути, за да се позволи спонтанно смесване на двата разтвора.
5. След това смесете капката ES2 (стрелка 2) със смесените по-рано капки и изчакайте 2 минути.
6. Прехвърлете яйцеклетката/яйцеклетките с минимално количество разтвор от смесените капки в капка ES3 за 6 – 10 минути. **Забележка:** еквилибрирането на яйцеклетката/яйцеклетките в ES3 е завършено, когато дебелината на zona pellucida е равна на перивителиновото пространство. Яйцеклетката/яйцеклетките ще се утаи/утаят на дъното на капката в рамките на 3 минути.
7. По време на еквилибрирането в ES3:
Капнете асептично една (1) капка 50 µL VS 2 минути преди завършването на еквилибрирането и подгответе CryoTip (Фиг. 3), тръбичката HSV (Фиг. 4) или Cryolock (Фиг. 5) за зареждане:

ЗАБЕЛЕЖКА: Преди да започнете процедурата, проверете внимателно изделието и върха за витрификация.

- CryoTip: свържете към спринцовката Hamilton или към подходящ аспирационен инструмент с помощта на конектор или адаптер, за да осигурите пълно улпънение. **ЗАБЕЛЕЖКА:** Дръжте ръкава на металния капак над изтегляния фин връх, за да го предпазите, докато бъде готов за изтегляне на спесимените.
- Тръбичка HSV: свържете по-дългия край на синьото пластмасово изделие за вкарване към оцветения край на манипулационния прът.
- Cryolock: откачете капачката.

8. Следващите стъпки (9 – 13) трябва да бъдат завършени в рамките на 80 – 110 секунди. ВНИМАНИЕ: Излагането на спесимените на VS трябва да бъде ограничено, за да се предотврати цитотоксичност. Спесименът/спесимените изплуват/изплуват във VS, така че настройте фокуса чрез микроскопа, за да поддържате непрекъснато визуализиране по време на излагането и дръжте наблизно върха на трансфериращата пипета, за да осигурите бърз трансфер между капките VS. Вижте Фигура 6.
9. След като еквилибрирането в ES завърши, изтеглете малко ES в трансфериращата пипета и прехвърлете спесимена/спесимените с минимално количество от капката ES в капката VS за 30 секунди.
10. Заредете и уплътнете с топлина CryoTip, както следва (вж. Фигура 7a):
 - Плъзнете ръкава на металния капак по дължината на CryoTip, за да откриете финия, чуплив край на върха.
 - Докато боравите с CryoTip и спринцовка Hamilton и същевременно наблюдавате под микроскоп, внимателно аспирирайте малко количество VS до маркировка № 1 на CryoTip.
 - Продължете да наблюдавате под микроскоп и внимателно аспирирайте спесимена с VS до маркировка № 2 на CryoTip.
 - Сега наблюдавайте директно CryoTip и аспирирайте още VS до маркировка № 3.
 - Спесименът трябва да се намира между маркировки № 2 и № 3.
 - Уплътнете с топлина (уплътнение № 1) CryoTip на (или точно под) маркировка № 1 и плъзнете ръкава на капака обратно надолу, за да покрие и предпазва финия, чуплив връх.
 - Внимателно извадете CryoTip от аспирационния инструмент и адаптера, а след това уплътнете с топлина (уплътнение № 2) дебелия край на CryoTip над маркировка № 4.
 - Потопете покрития CryoTip директно в течен азот (охлаждане със скорост от $-12\,000^{\circ}\text{C/min}$) (вж. Фигура 7b).
- Заредете и уплътнете тръбичката HSV, както следва:
 - С помощта на пипета внимателно поставете спесимена/спесимените в улея на капиллярната тръба на 1 mm от края. Капката, която съдържа спесимена/спесимените, трябва да бъде по-малка от 0,5 μl . Най-много 2 яйцеклетки или ембриона за всяка капиллярна тръба.
 - Незабавно поставете капиллярната тръба и манипулатора в тръбичката и натиснете, докато правоъгълната част на манипулатора влезе в контакт с разширения край на тръбичката.
 - Притиснете леко тръбичката между палеца и показалеца си и извадете изделието за вкарване.
 - Докато държите тръбичката на място, уплътнете отворения край с помощта на уплътнител SYMS.
 - С помощта на пинцети задръжте тръбичката в зоната на манипулационния прът.
 - Бързо потопете вертикално цялата тръбичка в LN_2 . Внимателно раздвижете тръбичката в LN_2 за няколко секунди, така че да се избегне образуване на изолиращ въздушен мехур около нея.
- Заредете Cryolock, както следва:
 - С помощта на микропипета изтеглете внимателно най-много 2 спесимена на вдлъбнатата повърхност на върха (страната с логото на Cryolock), около 3 mm ($1/8''$) от края му (използвайте черната маркировка като отправна точка), като премахнете излишния криозащитен разтвор и оставете възможно най-малко витрификационно средство ($\leq 1\,\mu\text{l}$).
 - Опция А: Преди да потопите Cryolock в LN_2 , незабавно вкарайте върха в капачката и го завъртете, докато го застопорите
 - Опция В: Веднага потопете върха и капачката в LN_2 . Изчакайте мехурчетата да спрат, за да се позволи еквилибриране. Внимателно вкарайте върха в капачката и го завъртете, докато го застопорите.
 - ЗАБЕЛЕЖКА: Опция В не е разрешена за използване в САЩ.
 - Бързо потопете Cryolock в течен азот.
 - ЗАБЕЛЕЖКА: Винаги съхранявайте Cryolock с капачката надолу.
11. Поставете витрифицирания CryoTip, тръбичката HSV или Cryolock в потопената в LN_2 пълна криотръба или бокал (върху криопръчката). Затворете криотръбата (или бокала) или я закрепете с върха надолу с друга незатворена криотръба, за да фиксирате витрифицираното изделие в течния азот.
12. Преместете резервоара с LN_2 близо до криокамера с LN_2 и прехвърлете пълната криопръчка в криокамерата за дългосрочно съхранение.

В. ЕМБРИОНИ (РН в blastocyst):

Протокол за витрификация:

1. Капнете асептично една капка 50 μL ES върху обърнат капак на петриево блюдо.
 2. Извадете блюдото за култивиране с ембрион/ембриони от инкубатора и проверете качеството на спесимена/спесимените под микроскоп. Когато е възможно, изберете само ембриона/ембрионите с най-добро качество за витрификация.
 3. Внимателно прехвърлете спесимените с минимално количество от средата (до два наведнъж) от блюдото за култивиране в капката ES и включете таймера. Ембрионите трябва да се урівновесят в капката ES бавно чрез свободно падане в продължение на 6 – 10 минути. Забележка: Спесименът ще се свие и след това постепенно ще се върне към първоначалния си размер, което показва, че еквилибрирането е завършено.
- ВНИМАНИЕ: По време на еквилибрирането в капки ES и VS сведете до минимум излагането на спесимена/спесимените на светлина.
4. По време на еквилибрирането в ES:
 - Пригответе една капка 50 μL разтвор VS, както е показано на Фиг. 8, и подгответе CryoTip, тръбичка HSV или Cryolock за зареждане.

Следвайте протокола, описан по-горе (раздел А – Протокол за витрификация на яйцеклетки [MI]), от стъпка 9 до стъпка 12 за излагане на разтвори VS, зареждане на CryoTip, тръбичка HSV или Cryolock, потапяне в LN₂ и дългосрочно съхранение.

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 замразяване (Vit Kit-Freeze) 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.

Като допълнителна предпазна мярка по време на процедурата за подготовка препоръчваме всеки CryoTip да преминава внимателна проверка при изваждане от опаковката. Преди употреба CryoTips трябва да се проверят с подходящо увеличение (с мощност 40x) за възможна повреда (напр. счупване или пукнатини по върха), възникнала при транспортиране.

Не използвайте епруветка с разтвор, при която има ясни признаци на повреда, теч, частици, замъгляване или променен цвят. Изхвърлете продукта съгласно приложимите 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.

INDIKACIJE ZA UPOTREBU

Komplet Vit Kit-Freeze namijenjen je primjeni u postupcima potpomognute oplodnje za vitifikaciju i čuvanje ljudskih oocita (MI) i zigota u pronuklearnom (PN) stadiju sve do embrija u stadiju diobe 3. dana i embrija u stadiju blastociste. Komplet je namijenjen uporabi s proizvodima CryoTip (kataloški br. 40709) i Vitricification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) za optimalan oporavak uzoraka.

OPIS PROIZVODA

Equilibration Solution-ES otopina je za ekvibraciju puferirana HEPES-om formule Medium-199 koja sadrži gentamicin sulfat, po 7,5 % (v/v) dimetil sulfoksida (DMSO) i etilen glikola te 20 % (v/v) proizvoda Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS otopina je za vitifikaciju puferirana HEPES-om formule Medium-199 koja sadrži gentamicin sulfat, po 15 % (v/v) DMSO-a i etilen glikola, 20 % (v/v) DSS-a te 0,5 M saharoze.

DSS je proteinski dodatak koji se sastoji od 50 mg/ml humanog serumskog albumina (HSA) terapijske kvalitete i 20 mg/ml deksrana. DSS se upotrebljava u koncentraciji od 20 % (v/v) u kompletu Vit Kit-Freeze, čime se postiže ukupna konačna koncentracija od 10 mg/ml HSA i 4 mg/ml deksrana.

Ove se dvije otopine moraju upotrebljavati sekvencijalno prema postepenom protokolu vitifikacije za mikropipeti.

SASTAV

Soli i ioni

Natrijev klorid
Natrijev fosfat
Kalijev klorid
Magnezijev sulfat
Natrijev acetat
Kalcijev klorid
Kolin klorid
Željezov nitrat

Prolin
Tirozin
Alanin
Asparaginska kiselina
Glutaminska kiselina
Izoleucin
Leucin
Metionin
Fenilalanin
Serin

Pufer

Natrijev bikarbonat
HEPES

Pokazatelj pH

Fenolno crvenilo

Aminokiseline

Arginin
Glicin
Histidin
Lizin

Antioksidansi

Glutation

Ostalo

Adenin sulfat
Deoksiriboza
Riboza
Gvanin
Uracil
Ksantini
Timin
Hipoksantini
Adenozin

Vitamini i minerali

Kalciferol
Askorbinska kiselina
Aminobenzojeva kiselina
Nikotinska kiselina
Nikotinamid
Pantotenska kiselina
Riboflavin
Tiamin
Biotin

Piridoksin
Natrijev bisulfat
Folna kiselina
Alfa-tokoferol

Antibiotici

Gentamicin sulfat

Energetski supstrati

Glukoza
Inozitol

Bjelančevina

Humani serumski albumin

Kriozaštitno sredstvo

Dekstran
Saharaza
Etilen-glikol
Dimetilsulfoksid

Voda

Voda kvalitete za injekcije

OSIGURAVANJE KVALITETE

Otopine u kompletu Vit Kit-Freeze membranski su filtrirane i aseptički obrađene prema potvrđenim proizvodnim postupcima.

Svaka šarža kompleta Vit Kit-Freeze ispituje se sljedećim ispitivanjima:

Otopine i proizvodi CryoTip.

Endotoksin prema metodologiji Limulus amebocitnog lizata (LAL) ($\leq 0,6$ EU/ml)

Analiza mješeg embrija (jedna stanica) (≥ 80 % proširena blastocista)

Sterilnost prema trenutačnom testu sterilnosti Američke farmakopeje (USP) <71> (prolazan rezultat)

Svi se rezultati bilježe na potvrdi o analizi za specifičnu šaržu koja je dostupna na upit.

POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU UKLJUČENI U OPSEG ISPORUKE

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (kataloški br. 40709) ili slamka HSV Straw (kataloški br. 25246-25251) ili uređaj Cryolock™ (kataloški br. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Priključak Irvine Scientific, LLC (kataloški br. 40736) ili drugi prilagodnik
- Sterilne Petrijeve zdjelice (50 × 9 mm, Falcon 351006 ili proizvod jednake kvalitete)
- Krioeppravke (4,5 ml) i čašice ili aluminijски držači (cryocanes)
- Kultivacijski medij Modified HTF – HEPES (kataloški br. 90126) s dodanim proteinom
- Hijaluronidaza (kataloški br. 90101)
- Rukavice za jednokratnu uporabu
- Štrcaljka Hamilton GASTIGHT® (50 µl, kataloški br. 80901) ili drugi alat za aspiraciju
- Prijenosne pipete (pipete od vučenog stakla ili vršci mikropipeta s unutarnjim promjerom vrška od ~200 µm)
- Pinceta ili hvataljka
- Impulsni toplinski uređaj za brtvljenje
- Uređaj za brtvljenje SYMS za slamku HSV Straw
- Štoperica ili brojač vremena
- Spremnik za tekući dušik (vakuumska boca ili spremnik od stiropora s poklopcem, volumen 1 – 2 l)
- Tekući dušik (dovoljan volumen da dubina u spremniku bude 4 inča (10 cm))

UPUTE ZA UPORABU

Zahtjevi za komponente kompleta Vit Kit-Freeze (za svaku primjenu):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl za protokol vitifikacije za oocite
ili
50 µl za protokol vitifikacije za embrije
- Vitrification Solution (VS):
50 µl za protokol vitifikacije
- 1 CryoTip ili HSV Straw ili Cryolock (za pohranu do 2 uzoraka)
- 1 priključak

PROTOKOL VITRIFIKACIJE:

NAPOMENA: Vršite postupke na sobnoj temperaturi (20 – 27 °C). NE upotrebljavajte zagrijani stolić mikroskopa za sljedeće postupke. **OPREZ:** Što manje izlažite uzorak svjetlosti tijekom ekvibracije u otopinama ES i VS.

1. Zagrijte na sobnu temperaturu (20 – 27 °C) potrebnu količinu otopina ES i VS. **NAPOMENA:** Ne zagrijavajte cijele ampule otopina ES i VS na sobnu temperaturu ako svaki put trebate samo dio otopine. Bolje je odrediti alikvot za količinu koju ćete upotrijebiti i odmah nakon toga vratiti ampule na 2 – 8 °C. Medij Modified HTF (HEPES) s proteinom također je potreban za protokol vitifikacije za oocite.
2. Napunite tekućim dušikom spremnik za tekući dušik (dovoljno da postigne dubinu od 4 inča (10 cm) ili da krioepruveta na držaču bude potpuno uronjena) i položite ga blizu mikroskopa. Pričvrstite krioepruvetu ili čašicu (bez čepa) na donju stezaljku aluminijskog držača i uronite je u tekući dušik da biste je pripremili za čuvanje vitrificiranih uzoraka.
3. Odredite broj uzoraka koje ćete vitrificirati.
4. Zabilježite potrebne podatke na svaku sterilnu Petrijevu zdjelicu (ili poklopac) i uređaj za kriogenu pohranu.
5. Prije upotrebe nježno dvaput preokrenite svaku ampulu otopine ES i VS da biste promiješali sadržaj.
6. Pripremite zdjelicu s kapljicama otopina za vitifikaciju kako slijedi:

A. Protokol vitifikacije za OOCITE (MII):

NAPOMENA 1: Ogolite preuzete oocite hijaluronidazom da biste potvrdili jesu li u metafazi II (MII).

NAPOMENA 2: Informacije o protokolu vitifikacije za embrije potražite u odjeljku B.

1. Aseptički dodajte kap od 20 µl kultivacijskog medija, Modified HTF – HEPES s proteinom, i ES u neposrednoj blizini na preokrenuti poklopac sterilne Petrijeve zdjelice kako je prikazano na slici 1. te položite zdjelicu na stolić mikroskopa:
 - jednu kap medija Modified HTF (HEPES s proteinom) od 20 µl
 - tri kapi otopine ES od 20 µl (ukupno 60 µl) (ES1, ES2, ES3)
2. Izvadite iz inkubatora zdjelicu za kultivaciju s oocitima u metafazi II i provjerite količinu uzoraka pod mikroskopom. Ako je moguće, odaberite oocit(e) u metafazi II samo najbolje kvalitete.
OPREZ: Što manje izlažite uzorak (uzorke) svjetlosti tijekom ekvibracije u kapljicama H, ES i VS.
3. Prenesite oocit (do 2 odjednom) s minimalnim volumenom medija iz zdjelice za kultivaciju (u inkubatoru) u kap H od 20 µl na jednu minutu.
4. Spojite kap H s otopinom ES1 (vidi sl. 1., strelicu 1.) vrškom prijenosne pipete i pustite da se spontano miješanje dviju otopina odvija 2 minute.
5. Zatim spojite kap otopine ES2 (strelica 2.) s prethodno spojenim kapima i ostavite 2 minute.
6. Prenesite oocit(e) s minimalnim volumenom otopine iz spojene kapi u kap otopine ES3 na 6 – 10 minuta. **Napomena:** ekvibracija oocita u ES3 gotova je kad se ujednači debljina *zone pellucide* i prostora perivitelina. Oocit(i) će se nataložiti na dno kapi unutar 3 minute.
7. Tijekom ekvibracije u ES3:
Aseptički dodajte jednu (1) kap otopine VS2 od 50 µl dvije minute prije završetka ekvibracije i pripremite CryoTip (sl. 3.), HSV Straw (sl. 4.) ili Cryolock (sl. 5.) za punjenje:

NAPOMENA: Prije postupka pomno ispitajte uređaj za vitifikaciju i držak.

- CryoTip: pričvrstite štrcaljku Hamilton ili odgovarajući alat za aspiraciju s pomoću priključka ili prilagodnika da biste osigurali čvrstu zabrtvljenost. **NAPOMENA:** Zadržite metalnu ovojnici preko fino izvučenog vrška da biste ga zaštitili dok ne budete spremni staviti uzorke.
 - HSV Straw: pričvrstite dulji kraj plavoga plastičnog uređaja za umetanje na obojeni kraj štapića za rukovanje.
 - Cryolock: odvojite čep.
8. Sljedeće korake (9 – 13) valja završiti unutar 80 – 110 sekundi. **OPREZ:** Ograničite izlaganje uzoraka otopini VS da ne bi došlo do citotoksičnosti. Budući da uzorak (uzorci) obično plutaju u otopini VS, prilagodite fokus kroz mikroskop da biste zadržali stalnu vidljivost tijekom izlaganja i držite vršak prijenosne pipete u blizini da biste osigurali brz prijenos između kapi VS. Pogledajte sliku 6.
 9. Nakon što završi ekvibracija u otopini ES, uzмите malo otopine ES prijenosnom pipetom i prenesite uzorak (uzorke) s minimalnim volumenom iz kapi otopine ES u kap otopine VS na 30 sekundi.
 10. Napunite i zabrtvite CryoTip na sljedeći način (pogledajte sliku 7.a):
 - Povucite metalnu ovojnici po slamki CryoTip da biste otkrili fini, krhki vršak.
 - Dok promatrate pod mikroskopom, s pomoću slamke CryoTip i štrcaljke Hamilton pažljivo aspirirajte mali volumen otopine VS do 1. oznake na slamki CryoTip.
 - Nastavite promatrati pod mikroskopom i nježno aspirirajte uzorak s otopinom VS do 2. oznake na slamki CryoTip.
 - Sada izravno promatrajte CryoTip i aspirirajte još otopine VS do 3. oznake.

- Uzorak se mora nalaziti između 2. i 3. oznake.
- Toplinski zabrtvite (1. brtva) CryoTip na 1. oznaci (ili odmah ispod nje) te povucite ovojnicu prema dolje da biste pokrili i zaštitili fini, krhki vršak.
- Pažljivo uklonite CryoTip s alata za aspiraciju i prilagodnika te zatim toplinski zabrtvite (2. brtva) debeli kraj slamke CryoTip iznad 4. oznake.
- Uronite pokrivni CryoTip izravno u tekući dušik (hlađenje brzinom od $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) (pogledajte sliku 7.b).

Napunite i zabrtvite slamku HSV Straw na sljedeći način:

- Mikropipetom pažljivo stavite uzorak (uzorke) u žlijeb kapilarnog štapića 1 mm od kraja. Kap koja sadrži uzorak (uzorke) mora biti manja od 0,5 μl . Stavite najviše 2 oocita ili embrija u svaki kapilarni štapić.
- Odmah stavite kapilarni štapić i instrument za umetanje u slamku te gurajte dok pravokutni dio instrumenta za umetanje ne dođe u dodir s trapezastim krajem slamke.
- Blago stisnite slamku između palca i kažiprsta te uklonite uređaj za umetanje.
- Dok još držite slamku na mjestu, zabrtvite otvoreni kraj s pomoću uređaja za brtvljenje SYMS.
- Pincetom držite slamku na području štapića za rukovanje.
- Brzo okomito uronite cijelu slamku u tekući dušik (LN_2). Nježno miješajte LN_2 slamkom nekoliko sekundi da biste spriječili stvaranje izolacijskog sloja zračnih mjehurića oko slamke.

Napunite uređaj Cryolock kako slijedi:

- Mikropipetom pažljivo stavite najviše 2 uzorka na udubljenu površinu vrška (na istoj se strani nalazi logotip Cryolock) otprilike 3 mm ($1/8''$) od ruba vrška (upotrijebite oznaku oznaku za orijentaciju) te pritom uklonite višak kriozastitne otopine i ostavite što manje vitrificacijskog medija ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$).
- Opcija A: Prije nego što uronite Cryolock u tekući dušik (LN_2), odmah pažljivo umetnite vršak u čep i čvrsto ga završite dok se ne učvrsti.
- Opcija B: Odmah uronite vršak i čep u tekući dušik (LN_2). Pričekajte da pjenušanje prestane da biste omogućili ekvilibraciju. Pažljivo umetnite vršak u čep i čvrsto ga završite dok se ne učvrsti.

NAPOMENA: Opcija B nije odobrena u SAD-u.

- Brzo zaronite Cryolock u tekući dušik.

NAPOMENA: Uvijek čuvajte Cryolock tako da je čep okrenut prema dolje.

11. Stavite vitrificirani CryoTip, HSV Straw ili Cryolock u uronjenu krioepruvetu ili čašicu (na aluminijskom držaču) ispunjenu tekućim dušikom (LN_2). Stavite čep na krioepruvetu (ili čašicu) ili je pričvrstite preokrenutu s još jednom nezačepljenom krioepruvetom da biste osigurali vitrificirani uređaj u tekućem dušiku.
12. Primaknite spremnik tekućeg dušika (LN_2) kriozamrzivač s LN_2 i prenesite aluminijski držač sa sadržajem u kriozamrzivač na dugoročnu pohranu.

B. EMBRIJI (od pronuklearnog stadija do stadija blastociste):

Protokol vitifikacije:

1. Aseptički dodajte jednu kap otopine ES od 50 μl na preokrenuti poklopac Petrijeve zdjelice.
2. Izvadite iz inkubatora zdjelicu za kultivaciju s embrijem (embrijima) i provjerite količinu uzor(a)ka pod mikroskopom. Ako je moguće, za vitifikaciju odaberite samo embrio (embrije) najbolje kvalitete.
3. Pažljivo prenesite uzorak (do dva odjednom) s minimalnim volumenom medija iz zdjelice za kultivaciju u kap otopine ES i pokrenite brojač vremena. Embriji bi se trebali polako slobodnim padom ekvilibrirati u kapi otopine ES 6 – 10 minuta. Napomena: Uzorak će se smanjiti i zatim postupno vratiti u prvotnu veličinu, što znači da je ekvilibracija gotova. OPREZ: što manje izlažite uzorak (uzorke) svjetlosti tijekom ekvilibracije u kapljicama otopina ES i VS.
4. Tijekom ekvilibracije u otopini ES:
 - Postavite jednu kap otopine VS od 50 μl kako je prikazano na slici 8. i pripremite CryoTip, HSV Straw ili Cryolock za punjenje.

Slijedite prethodno navedeni protokol (odjeljak A – Protokol vitifikacije za oocite (MI)) od 9. do 12. koraka u odnosu na izlaganje otopinama VS, punjenje proizvoda CryoTip, HSV Straw ili Cryolock, uranjanje u tekući dušik (LN_2) i dugoročnu pohranu. 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 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kada se otopine iz kompleta Vitrefication Freeze 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.

Kao dodatnu mjeru opreza tijekom pripreme preporučujemo da pažljivo proučite svaku slamku CryoTip kada je izvadite iz pakiranja. Prije uporabe proučite slamke CryoTip pod odgovarajućim uvećanjem (40x) i provjerite je li tijekom transporta došlo do eventualne štete (npr. slomljenih vršaka ili pukotina).

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 vitrifikacije na oocite 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 ispitan 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 imunodeficijencije (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 primjenjujte 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.

TIWISSIJA GHALL-UE: Ghall-Użu Professionali Biss.

INDIKAZZJONI GHALL-UŻU

Vit Kit-Freeze huwa maħsub għall-użu fil-proċeduri ta' riproduzzjoni assistita għall-vitrifikazzjoni u l-ħażna ta' oociti tal-umani (MI), żigoti pronukleari (PN) permezz ta' embrijuni fl-istadju tal-qsim tat-3 jum u embrijuni f-istadju tal-blastocist. Dan il-kitt huwa ddisinjat għall-użu ma' CryoTip (Katalgu #40709), u Vitricification Thaw Kit (Vit Kit-Thaw) għall-aħjar irkupru tal-kampjuni.

DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

Equilibration Solution-ES hija soluzzjoni ta' Medium-199 ibbaferjata b'HEPES li fiha gentamicin sulphate, 7.5% (v/v) ta' kull DMSO u ethylene glycol u 20% (v/v) ta' Dextran Serum Supplement (DSS).

Vitrification Solution-VS hija soluzzjoni ta' Medium-199 ibbaferjata b'HEPES li fiha gentamicin sulphate, 15% (v/v) ta' kull DMSO u ethylene glycol, 20% (v/v) DSS u 0.5 M sucrose.

DSS huwa supplement tal-proteini li jikkonsisti f'50 mg/mL ta' grad terapewtiku ta' Albumina ta' Serum Uman (HSA) u 20 mg/mL Dextran. DSS jintuża f'koncentrazzjoni ta' 20% (v/v) f'Vit Kit-Freeze għal koncentrazzjoni finali ta' 10 mg/mL HSA u 4 mg/mL Dextran.

Dawn iż-żewġ soluzzjonijiet għandhom jintużaw f'sekwenza skont il-protokoll ta' step-wise microdrop vitrification (vitrifikazzjoni progressiva ta' qtar ta' daqs mikro).

GHAMLA

Mluħa u Joni

Sodium Chloride
Sodium Phosphate
Potassium Chloride
Magnesium Sulfate
Sodium Acetate
Calcium Chloride
Choline Chloride
Ferric Nitrate

Buffer

Sodium Bicarbonate
HEPES

Indikatur tal-pH

Phenol Red

Aċidi Amminiċi

Arginine
Glycine
Histidine
Lysine

Proline
Tyrosine
Alanine
Aspartic Acid
Glutamic Acid
Isoleucine
Leucine
Methionine
Phenylalanine
Serine
Threonine
Tryptophan
Valine
Hydroxyproline
Cystine
Cysteine

Antiossidant

Glutathione

Oħrajn

Adenine Sulfate
Deoxyribose
Ribose
Guanine
Uracil
Xanthine
Thymine
Hypoxanthine
Adenosine

Vitamini u Minerali

Calciferol
Ascorbic Acid
Aminobenzoic Acid
Nicotinic Acid
Nicotinic Acid Amide
Pantothenic Acid
Riboflavin
Thiamine
Biotin

Pyridoxine
Sodium Bisulfite
Folic Acid
Alpha-Tocopherol

Antibijotiċi

Gentamicin Sulfate

Substrati tal-Energija

Glucose
Inositol

Proteini

Human Serum Albumin

Krijoprotettant

Dextran
Sucrose
Ethylene Glycol
Dimethylsulfoxide

Ilma

Kwalità tal-WFI

ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

Is-soluzzjonijiet ta' Vit Kit-Freeze huma mogħddija minn filtru ta' membrana u pproċessati b'mod asettiku b'konformità.

Kull lott ta' Vit Kit-Freeze isirulu t-testijiet li ġejjin:

Soluzzjonijiet u CryoTips.

Endotossina bil-metodoloġija Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (≤ 0.6 EU/mL)

Mouse Embryo Assay (b'ċellola waħda) ($\geq 80\%$ tal-blastocist estji)

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.

MATERJALI MEHTIEĠA IŻDA MHUX INKLUŻI

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (Katalgu #40709) jew HSV Straw (Katalgu #25246-25251) jew Cryolock™ (Katalgu #CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Irvine Scientific, LLC Connector (Katalgu #40736) jew adattur ieħor
- Dixxijiet petri sterili (50 X 9 mm, Falcon 351006 jew ekwivalenti)
- Tubi krijogeniċi (4.5 mL) jew goblets u cryocanes
- Modified HTF - HEPES (Katalgu #90126) midjum għall-koltura supplementat bil-proteini
- Hyaluronidase (Katalgu #90101)
- Ingwanti li jintremew wara l-użu
- Siringa Hamilton GASTIGHT® (50 µL, Katalgu #80901) jew għodda oħra tal-aspirazzjoni
- Pipetti għat-trasferiment (pipetti tal-ħġiġ migbud jew ponot tal-mikropipetti b'dijametru intern tal-ponta ta' ~200 µm)
- Pinzett jew tnaljetti
- Tagħmir tal-Issigillar bis-Shana bl-Impulsi
- Tagħmir tal-Issigillar SYMS għall-HSV Straw
- Kronometru jew tagħmir li jżomm il-hin
- Kontenitur għan-nitroġenu likwidu (kontenitur dewar jew tal-istyrofoam bl-għatu, volum ta' 1-2 L)
- Nitroġenu likwidu (volum biżżejjed biex jilħaq fond ta' 4 pulzieri (10 cm) fil-kontenitur)

ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

Komponenti meħtieġa ta' Vit Kit-Freeze (għal kull applikazzjoni):

- Equilibration Solution (ES):
60 µL għall-Protokoll tal-Vitrifikazzjoni tal-Ooċiti Jew
50 µL għall-Protokoll tal-Vitrifikazzjoni tal-Embrijuni
- Vitrification Solution (VS):
50 µL għall-Protokoll tal-Vitrifikazzjoni
- 1 CryoTip jew HSV Straw jew Cryolock (jesa' sa 2 kampjuni)
- 1 Konnettur

PROTOKOLL TAL-VITRIFIKAZZJONI:

NOTA: Il-proċeduri għandhom isiru f'temperatura ambjentali (20-27°C). TUẂAX pjattaforma tal-mikroskopju msahħna għall-proċeduri li ġejjin. **ATTENZJONI:** Imminimizza l-espożizzjoni tal-kampjun għad-dawl waqt l-ekwilibrizzjoni fis-soluzzjonijiet ES u VS.

1. Ġib il-kwantità ta' ES u VS li għandha tintuża għal temperatura ambjentali (20-27°C). **NOTA:** Evita li ġgħib il-kunjetti kollha ta' ES u VS għal temperatura ambjentali ripetutament meta tkun meħtieġa parti parzjali tas-soluzzjoni kull darba. Ikun aħjar li tagħmel il-kwantità li għandha tintuża f'alikwoti u tirritorna l-kunjetti għal temperatura ta' 2-8°C minnufih wara jsiru l-alikwoti. Għall-protokoll tal-vitrifikazzjoni tal-oociti huwa meħtieġ ukoll HTF (HEPES) immodifikat.
2. Imla l-kontenitur tan-nitroġenu likwidu bin-nitroġenu likwidu (biżżejjed biex tilhaq fond ta' 4 pulzieri (10 cm) jew biex tgħaddas kompletament it-tubu krijoġeniku fuq il-bastun) u poġġih viċin il-mikroskopju. Wahhal tubu krijoġeniku jew goblet (mingħajr tapp) mal-morsa tal-qiegħ ta' cryocane u għaddas fin-nitroġenu likwidu bi preparazzjoni għall-ħażna tal-kampjuni vvitrifikati.
3. Stabbilixxi n-numru ta' kampjuni li għandhom jiġu vvitrifikati.
4. Wahhal tikketta bl-informazzjoni meħtieġa ma' kull Petri dixx (jew għatu) sterili u tagħmir tal-ħażna Cryo.
5. Bil-mod aqleb kull kunjett ta' ES u VS rasu 'l isfel darbtejn biex tħawwad il-kontenut qabel l-użu.
6. Ipprepara d-dixx bil-qtar tas-soluzzjonijiet għall-Proċedura tal-Vitrifikazzjoni kif ġej:

A. Protokoll tal-Vitrifikazzjoni tal-OOCITI (MII):

NOTA 1: L-oociti miġbura għandhom jitneżżgħu b'Hyaluronidase biex jiġi kkonfermat li huma MII.

NOTA 2: Irreferi għat-Taqsim B għall-protokoll tal-vitrifikazzjoni tal-embrijuni.

1. Iddispensa b'teknika asettika qatra ta' 20 µL tal-midjum għall-koltura, modified HTF - HEPES bil-proteini, u ES viċin tal-għatu bil-maqlob ta' Petri dixx sterili kif muri fil-Figura 1, u poġġi d-dixx fuq il-pjattaforma tal-mikroskopju:
 - qatra waħda ta' 20 µL ta' Modified HTF (HEPES bil-proteini)
 - tliet qatriet ta' 20 µL (total ta' 60 µL) ta' ES (ES1, ES2, ES3)
2. Nehħi d-dixx tat-tkabbir tal-koltura li fih l-oociti MII mill-inkubatur u ċċekkja l-kwalità tal-kampjuni bil-mikroskopju. Fejn possibbli, għażel biss l-oociti tal-istadju MII tal-aħjar kwalità. **ATTENZJONI:** Imminimizza l-espożizzjoni tal-kampjun(i) għad-dawl waqt l-ekwilibrizzjoni fil-qtar H, ES u VS.
3. Ilttrasferixxi l-oociti (sa 2 kull darba) b'volum minimu ta' midjum mid-dixx tat-tkabbir tal-koltura (fil-inkubatur) fil-qatra ta' 20 µL ta' H għal minuta waħda.
4. Għaqqad il-qatra H ma' ES1 (Ara Fig. 1, vlegġa 1) bil-ponta tal-pipetta tat-trasferiment u stenna li jseħh t-taħlit spontanju taż-żewġ soluzzjonijiet għal 2 minuti.
5. Imbagħad għaqqad il-qatra ta' ES2 (vlegġa 2) mal-qtar magħquda qabel u halli hom għal 2 minuti.
6. Ilttrasferixxi l-oociti b'volum minimu tas-soluzzjoni mill-qatra magħquda ma' qatra ta' ES3 għal 6-10 minuti. **Nota:** L-ekwilibrizzjoni tal-oociti f'ES3 hija kompluta meta l-ħxuna taż-żona pellucida tkun daqs l-ispażju tal-perivitelline. L-oociti jinżlu fil-qiegħ tal-qatra fi żmien 3 minuti.
7. Matul il-perjodu tal-ekwilibrizzjoni f'ES3:
 - Iddispensa b'teknika asettika qatra waħda (1) ta' 50 µL ta' VS 2 minuti qabel ma titlesta kompletament l-ekwilibrizzjoni u pprepara l-CryoTip (Fig. 3), HSV Straw (Fig. 4), jew Cryolock (Fig. 5) għall-applikazzjoni:
 - NOTA:** Ezamina t-tagħmir tal-vitrifikazzjoni u l-ponta bir-reqqa qabel tibda l-proċedura
 - CryoTip: qabbad mas-siringa Hamilton jew ma' għodda tal-aspirazzjoni xierqa bil-użu ta' konnettur jew adattur biex tiggarantixxi għeluq ermetiku. **NOTA:** Żomm il-kopertura tal-metall fuq il-ponta fina estratta biex tipproteġiha sakemm tkun lest biex tgħabbi l-kampjuni.
 - HSV Straw: qabbad l-itwal tariff tat-tagħmir għall-inserzjoni tal-plastik blu mat-tarf ikkurlit tal-virga tal-manipulazzjoni.
 - Cryolock: nehħi t-tapp.
8. Il-fażijiet (9-13) li ġejjin għandhom jittlestew fi żmien 80-110 sekondi. **ATTENZJONI:** L-espożizzjoni tal-kampjuni għall-VS għandku jkun limitat biex tipprevjeni ċ-citotossicità. Il-kampjun(i) normalment jitla' (jittigħu) fil-wiċċ tal-VS, għalhekk aġġusta l-iffokar permezz tal-mikroskopju biex iżżomm viżwalizzazzjoni kontinwa matul l-espożizzjoni u żomm it-tarf tal-pipetta tat-trasferiment viċin biex tiggarantixxi t-trasferiment rapidu bejn il-qatriet tal-VS. Irreferi għal Figura 6.
9. Wara li titlesta l-ekwilibrizzjoni fl-ES, iġbed ftit ES fil-pipetta tat-trasferiment u ttrasferixxi l-kampjun(i) bil-volum minimu mill-qatra ta' ES fil-qatra ta' VS għal 30 sekonda.
10. Għabbi u ssiġilla bis-shana l-CryoTip kif ġej (Ara l-Figura 7a):
 - Żerżaq il-kopertura tal-metall 'il fuq mat-tul tal-CryoTip biex tesponi t-tarf fragli tal-ponta fina.
 - Waqt li timmanipula l-CryoTip u s-siringa Hamilton u waqt li tosserva bil-mikroskopju, iġbed bil-mod volum żgħir ta' VS sal-Marka #1 fuq il-CryoTip.
 - Kompl osserva bil-mikroskopju u bil-mod iġbed il-kampjun bil-VS sal-Marka #2 fuq il-CryoTip.
 - Issa osserva l-CryoTip direttament u iġbed aktar VS sal-Marka #3.
 - Il-kampjun għandu jkun bejn il-Marka #2 u l-Marka #3.

- Issigilla bis-shana (Sigill #1) I-CryoTip fuq (jew direttament taht) il-Marka #1, u żerżaq is-sleeve tal-kopertura lura 'l isfel biex tghatti u tipprotegi l-ponta fina u fragli.
- Nehhi I-CryoTip bil-mod mill-ghodda tal-aspirazzjoni u l-adattur u mbagħad issigilla bis-shana (Sigill #2) fit-tarf wiesa' tal-CryoTip 'il fuq mill-Marka #4.
- Ghaddas il-CryoTip mgħottija direttament fin-nitroġenu likwidu (iffrizar b'rata ta' ~12,000° C/min) (Ara I-Figura 7b).

Għabbi u ssigilla l-HSV straw kif ġej:

- Bl-użu ta' mikropipetta, iddepożita l-kampjuni b'mod delikat fil-kanal tal-virga kapillari 1 mm mit-tarf. Il-qatra li fiha l-kampjuni trid tkun anqas minn 0.5 µl. Massimu ta' 2 oċiiti jew embrijuni għal kull virga kapillari.
- Immedjatament poġġi l-virga kapillari u l-tagħmir tal-inserzjoni fl-istraw u mbotta sakemm il-parti rettangolari tat-tagħmir tal-inserzjoni tmiss mat-tarf mahrug tal-istraw.
- Aghfas l-istraw kemm kemm bejn is-saba' l-kbir u subgħajk u nehhi l-tagħmir tal-inserzjoni.
- Filwaqt li tkompli żżomm l-istraw f'postu, issigilla l-tarf miftuħ bl-użu ta' tagħmir tal-issigillar SYMS.
- Żomm l-istraw bl-użu tal-pinżetta fiż-żona tal-virga tal-manipulazzjoni.
- Ghaddas malajr l-istraw kollu fil-LN₂ f'pożizzjoni vertikali. Hawwad l-istraw b'mod delikat fil-LN₂ għal ftit sekondi biex tevita li jifforma saff ta' b'żieqaq ta' arja izolanti madwar l-istraw.

Għabbi I-Cryolock kif ġej:

- Bl-użu ta' mikropipetta, bil-mod tella' massimu ta' 2 kampjuni fuq il-wiċċ konkav tal-ponta (fuq l-istess naħa tal-logo tal-Cryolock) madwar 3 mm (1/8") mit-tarf tal-ponta (uża l-marka s-sewda bħala referenza), nehhi xi soluzzjoni żejda tal-krijoprotettant u halli l-anqas volum possibbli ta' midja tal-vitrifikazzjoni (≤ 1 µl).
 - Opzjoni A: Qabel tghaddas il-Cryolock fil-LN₂, dahhal immedjatament u b'mod delikat il-ponta fit-tapp u dawwar sewwa sakemm ikun sigur.
 - Opzjoni B: Immedjatament ghaddas il-ponta u t-tapp taht il-LN₂. Stenna sakemm tiegħaf il-formazzjoni tal-b'żieqaq biex tippermetti l-ekwilibrizzjoni. Bil-mod dahħal il-ponta fit-tapp, u dawwar sew sakemm tkun sigura biżżejjed.
- NOTA: Għażla B mhijiex awtorizzata għall-użu fl-Istati Uniti.
- Malajr ghaddas il-Cryolock fin-nitroġenu likwidu.
- NOTA: Dejjem aħżen il-Cryolock bit-tapp iħares 'l isfel.

11. Poġġi I-CryoTip, HSV straw jew Cryolock invitrifikati fit-tubu krijogeniku jew goblet mgħaddsa kompletament fil-LN₂ (fuq il-cryocane). Aghmel tapp mat-tubu krijogeniku (jew goblet) jew wahħlu rasu 'l isfel ma' tubu krijogeniku iehor mingħajr tapp sabiex iżżomm it-tagħmir invitrifikat fin-nitroġenu likwidu.
12. Ressaq il-kontenitur tal-LN₂ vicin il-friza krijogenika tal-LN₂ u ttrasferixxi l-cryocane bil-kontenut għall-friza krijogenika għall-ħażna fit-tul.

B. EMBRIJUNI (PN għal Blastocisti):

Protokoll tal-Vitrifikazzjoni:

1. Iddispensa b'teknika asettika qatra wahda ta' 50 µL ta' ES fuq għatu bil-maqblu ta' Petri dixx.
2. Nehhi d-dixx tat-tkabbir bl-embrijuni mill-inkubatur u cċekkja l-kwalità tal-kampjun(i) bil-mikroskopju. Fejn hu possibbli, aghżel biss l-embrijun(i) tal-aħjar kwalità għall-vitrifikazzjoni.
3. Ilttrasferixxi l-kampjuni bl-attezzjoni (sa tnejn kull darba) b'volum minimu ta' midjum mid-dixx tal-koltura għall-qatra ta' ES u ixgħel il-kronometru.
L-embrijuni għandhom jekwilibraw fil-qatra ta' ES bil-mod b'mod liberu għal 6-10 minuti.
Nota: Il-kampjuni l-ewwel jinxtorbu u mbagħad gradwalment jergħu lura għall-qies oriġinali tagħhom, u b'hekk jindikaw li l-ekwilibrizzjoni lesta.
ATTENZJONI: Imminimizza l-espożizzjoni tal-kampjun(i) għad-dawl waqt l-ekwilibrizzjoni fil-qtra ES u VS.
4. Matul dan il-perjodu ta' ekwilibrizzjoni fil-ES:
 - ipprepara qatra wahda ta' 50 µL ta' soluzzjoni ta' VS kif muri fil-Fig 8 u pprepara I-CryoTip, I-HSV Straw, jew il-Cryolock għall-applikazzjoni.

Segwi l-protokoll kif miktub hawn fuq (Taqsima A - Protokoll tal-Vitrifikazzjoni tal-Ooċiti [MII]) mill-punti 9 sa 12 għall-espożizzjoni għas-soluzzjonijiet VS, l-applikazzjoni tal-CryoTip, HSV Straw, jew Cryolock, l-immersjoni fil-LN₂ u l-ħażna fit-tul.

Għal aktar dettalji dwar l-użu ta' dawn il-prodotti, kull laboratorju għandu jikkonsulta l-proċeduri u l-protokoll tal-laboratorju tiegħu li ġew żviluppati u ottimizzati speċifikament għall-programm mediku individwali tiegħek.

ISTRUZZJONIJIET GħALL-ĦAŻNA U L-ISTABILITÀ

Aħżen il-kunjetti li għadhom mhux miftuħa fil-friza b'temperatura ta' 2°C sa 8°C. Meta jinħażnu skont l-istruzzjonijiet, is-Soluzzjonijiet tal-Vitrification Freeze Kit 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.

PREKAWZJONIJIET U TWISSIJET

Dan it-tagħmir huwa mahsub biex jintuża minn persunal imħarġejl fil-proċeduri ta' riproduttur assistita. Dawn il-proċeduri jinkludu l-applikazzjoni mahsuba li għaliha huwa intenzjonat dan it-tagħmir.

Il-faċilità ta' dan it-tagħmir hija responsabbli biex iżżomm it-traċċabilità tal-prodott u trid tkun konformi mar-regolamenti nazzjonali dwar it-traċċabilità, fejn applikabbli.

Bħala prekawzjoni addizzjonali matul il-proċedura ta' preparazzjoni, nirrakkomandaw li kull Cryotip jiġi eżaminat bir-reqqa meta jinħareġ mill-pakkett. Qabel ma jintużaw, il-CryoTips għandhom ikunu eżaminati taht ingrandiment adegwat (potenza 40x) għall-identifikazzjoni ta' xi hsarat (bħal ksar tal-ponta jew xquq) li setgħu sehhew matul it-trasport.

Tużax xi kunjett tas-soluzzjoni li juri evidenza ta' hsara, tnixxija, partiċelli, soluzzjoni mdardra jew varjazzjonijiet fil-kulur. Armi l-prodott skont ir-regolamenti applikabbli.

Biex tevita problemi ta' kontaminazzjoni, immanipula bl-użu ta' teknika asettika.

Bhalissa, il-letteratura tar-riċerka tindika li l-effetti fit-tul tal-vitrifikazzjoni fuq l-oociti u l-embrijuni għadhom mhux magħrufa.

Tużax flixxun jekk l-ippakkjar sterili tiegħu jkollu l-hsara.

UE: Miżuri standard biex jiġu evitati infezzjonijiet li jirriżultaw mill-użu ta' prodotti mediċinali ppreparati minn demm jew plażma umana jinkludu l-għażla tad-donaturi, skринing ta' donazzjonijiet individwali u ta' lotts ta' plażma għal markaturi speċifiċi ta' infezzjoni, u l-inklużjoni ta' miżuri effettivi fil-proċess tal-manifattura għall-inattivazzjoni/tneħhija ta' viruses. Minkejja dan, meta jingħataw prodotti mediċinali ppreparati minn demm jew plażma 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 stabbiliti. Hu rakkomandat bil-qawwa li kull darba li l-midjum għall-koltura ta' Irvine Scientific, LLC Reproductive Media Products jingħata lil pazjent, l-isem u n-numru tal-lott tal-prodott jiġu registrati 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 kits liċenzjati mill-FDA u ntweru li mhumiex reattivi għall-antikorpi tal-Epatite C (HCV), u għall-antikorpi 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 jittrażmetti l-infezzjoni, billi tuża prekawzjonijiet universali. Donaturi tal-materjal tas-sors ġew ittestjati wkoll għal CJD.

KONTRAINDIKAZZJONI

Il-prodott fih Gentamicin Sulfate. Għandhom jittiehdu prekawzjonijiet adegwati biex ikun żgurat li l-pazjent mhuwiex sensitizzat għal dan l-antibijotiku.

OPOZORILO ZA EU: Samo za profesionalno uporabo.

INDIKACIJE ZA UPORABO

Vit Kit-Freeze je namenjen za uporabo v postopkih asistiranе reprodukcije za vitrifikacijo in shranjevanje človeških oocitov (MI), pronuklearnih (PN) zigot prek zarodkov 3. dne cepitve in zarodkov v fazi blastociste. Ta komplet je zasnovan za uporabo s CryoTip (kataloška št. 40709) in kompletom za odtajanje vitrifikacije (Vit Kit-Thaw) za optimalno obnavljanje vzorcev.

OPIS PRIPOMOČKA

Equilibration Solution-ES je pufrana raztopina HEPES medija-199, ki vsebuje gentamicin sulfat, po 7,5 % (v/v) dimetil sulfoksida (DMSO) in etilenglikola ter 20 % (v/v) dopolnila seruma z dekstranom (DSS).

Vitrification Solution-VS je pufrana raztopina HEPES medija-199, ki vsebuje gentamicin sulfat, po 15% (v/v) dimetil sulfoksida (DMSO) in etilenglikola, 20 % (v/v) dopolnila seruma z dekstranom (DSS) in 0,5 M saharoze.

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-Freeze za ustvarjanje končne koncentracije 10 mg/ml HSA in 4 mg/ml dekstrana.

Ti dve raztopini se uporabljata zaporedno skladno s protokolom postopne vitrifikacije mikropiplicje.

SESTAVA

Soli in ioni

Natrijev klorid	Prolin
Natrijev fosfat	Tirozin
Kalijev klorid	Alanin
Magnezijev sulfat	Asparaginska kislina
Natrijev acetat	Glutaminska kislina
Kalcijev klorid	Izolevcin
Holinklorid	Levcin
Železov nitrat	Metionin
	Fenilalanin
	Serin

Pufer

Natrijev bikarbonat
HEPES

Indikator vrednosti pH

Fenol rdeče

Aminokisline

Arginin
Glicin
Histidin
Lizin

Hidroksiprolin
Cistin
Cistein
Antioksidant
Glutation

Drugo

Adenin sulfat
Deoksiriboza
Riboza
Gvanin
Uracil
Ksantin
Timin
Hipoksantin
Adenozin

Vitaminski minerali

Kalciferol
Askorbinska kislina
Aminobenzojska kislina
Nikotinska kislina
Amid nikotinske kisline
Pantotenska kislina
Riboflavin
Tiamin
Biotin

Piridoksin
Natrijev bisulfit
Folna kislina
Alfa-tokoferol

Antibiotiki

Gentamicin sulfat

Energijski substrati

Glukoza
Inozitol

Beljakovine

Humani serumski albumin

Krioprotektant

Dekstran
Saharaza
Etilenglikol
Dimetil sulfoksid

Voda

Kakovost, ki ustreza
vodi za injekcije

ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

Raztopine v Vit Kit-Freeze so bile membransko filtrirane in aseptično obdelane skladno z validiranimi proizvodnimi postopki.

Pri vsaki seriji Vit Kit-Freeze so bili izvedeni naslednji preizkusi:

raztopine in konice CryoTip,

- 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.

POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Irvine Scientific, LLC CryoTip (kataloška št. 40709) ali slamica HSV (kataloška št. 25246-25251) ali Cryolock™ (kataloška št. CL-R-CT-B, CL-R-CT-G, CL-R-CT-C, CL-R-CT-Y, CL-R-CT-O)
- Spojnik Irvine Scientific, LLC (kataloška št. 40736) ali drug adapter
- Sterilne petrijevke (50 X 9 mm, Falcon 351006 ali enakovredno)
- Krioeprovete (4,5 ml) ali čaše in kriopalčke
- Spremenjeni HTF – HEPES (kataloška št. 90126) gojišče za kulture z dodanimi beljakovinami
- Hialuronidaza (kataloška št. 90101)
- Rokavice za enkratno uporabo
- Brizga Hamilton GASTIGHT® (50 µl, kataloška št. 80901) ali drugo aspiracijsko orodje
- Prenosne pipete (izvlečene steklene pipete ali konice mikropipet z notranjim premerom konice ~200 µm)
- Pincete ali klešče
- Impulzni toplotni zatesnjevalnik
- Zatesnjevalnik SYMS za slamico HSV
- 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)

NAVODILA ZA UPORABO

Zahteve za komponente kompleta Vit Kit-Freeze (na uporabo):

- Equilibration Solution (ES):
60 µl za protokol vitifikacije oocitov
ali
50 µl za protokol vitifikacije embria
- Vitrification Solution (VS):
50 µl za protokol vitifikacije
- 1 CryoTip ali slamica HSV ali Cryolock (shrani do 2 vzorca)
- 1 spojnik

PROTOKOL VITRIFIKACIJE:

OPOMBA: Postopki se morajo opraviti pri sobni temperaturi (20–27 °C). Pri naslednjih postopkih NE uporabljajte ogrevane mizice mikroskopa. **OPOZORILO:** Zmanjšajte izpostavljenost vzorca svetlobi zaradi ekvibracije v raztopinah ES in VS.

1. Količina raztopine ES in VS, ki bo uporabljena, mora biti sobne temperature (20–27 °C). **OPOMBA:** Izogibajte se ponavljajočemu temperiranju celotnih vial z raztopino ES in VS na sobno temperaturo, če vsakič potrebujete le del raztopine. Bolje je razdeliti količino, ki bo uporabljena, in vrniti vialo na temperaturo 2–8 °C takoj po razdelitvi. Spremenjeni HTF (HEPES) z beljakovinami je potreben tudi za protokol vitifikacije oocitov.
2. Napolnite rezervoar za tekoči dušik s tekočim dušikom (dovolj je, če dosežete globino 4 palce (10 cm) ali da povsem potopite krioepruveto na palčki) in ga postavite v bližino mikroskopa. Pritrđite krioepruveto ali čašo (brez pokrovčka) na spodnjo sponko krioepruvete in jo potopite v tekoči dušik za pripravo za shranjevanje vitrificiranega vzorca.
3. Določite število vzorcev, ki bodo vitificirani.
4. Z nalepkami s potrebnimi informacijami označite vse sterilne petrijevke (ali pokrovčke) in kriogensko napravo za shranjevanje.
5. Dvakrat nežno obrnite vsako vialo z raztopinama ES in VS, da pred uporabo premešate vsebino.
6. Pripravite posodo s kapljicami raztopine za postopek vitifikacije, kot sledi:

A. Protokol vitifikacije OOCITOV (MII)

OPOMBA 1: Pridobljene oocyte je treba ogoliti s hialuronidazo, da preverite, ali so MII.

OPOMBA 2: Za protokol vitifikacije embriev glejte razdelek B.

1. Aseptično dodajte 20 µl kapljic gojišča za kulture, spremenjenega HTF – HEPES z beljakovinami, in ES v bližino na obrnjen pokrov sterilne petrijevke, kot je prikazano na sliki 1, nato pa postavite posodo na mizico mikroskopa:
 - ena 20-µl kapljica spremenjenega HTF (HEPES z beljakovinami);
 - tri 20-µl kapljice (skupno 60 µl) raztopine ES (ES1, ES2, ES3).
2. Odstranite posodo s kulturo, ki vsebuje oocyte MII, iz inkubatorja in preverite kakovost vzorcev pod mikroskopom. Če je mogoče, izberite le najboljšo kakovost oocitov v fazi MII.
OPOZORILO: Zmanjšajte izpostavljenost vzorca svetlobi zaradi ekvibracije v kapljicah H, ES in VS.
3. Prenesite oocit (do 2 sočasno) z minimalnim volumnom medija iz posode s kulturo (v inkubatorju) v 20-µl kapljico H za eno minuto.
4. Združite kapljice H v ES1 (glejte sliko 1, puščica 1) s konico prenosne pipete in za 2 minuti omogočite spontano mešanje obeh raztopin.
5. Nato združite kapljico ES2 (puščica 2) s predhodno združenima kapljicama in pustite 2 minuti.
6. Prenesite oocit(e) z minimalno količino raztopine iz združene kapljice v kapljico ES3 za 6–10 minut. **Opomba:** Ekvibracija oocitov v ES3 je končana, ko sta debelini zona pellucida in perivitelinskega prostora enaki. Oociti se bodo usedli na dno kapljice v roku 3 minut.
7. Med časom ekvibracije v ES3:
Aseptično dodajte eno (1) 50-µl kapljico VS 2 minuti pred končano ekvibracijo in pripravite konico CryoTip (slika 3), slamico HSV (slika 4) ali Cryolock (slika 5) za nalaganje:
OPOMBA: Pred začetkom postopka skrbno preglejte pripomoček za vitifikacijo in konico
 - CryoTip: priključite Hamiltonovo brizgo ali ustrezno aspiracijsko orodje z uporabo spojnika ali adapterja, da zagotovite tesnjenje. **OPOMBA:** Čevka kovinskega pokrovčka mora segati prek fine izvlčene konice, da jo zaščiti, dokler ni pripravljena za sprejem vzorca.
 - Slamica HSV: priključite daljši konec modrega plastičnega pripomočka za vstavljanje na obarvani konec ročaja.
 - Cryolock: odstranite pokrovček.
8. Naslednji koraki (9–13) morajo biti končani v 80–110 sekundah. **OPOZORILO:** Izpostavljenost vzorcev raztopini VS je treba omejiti, da preprečite citotoksičnost. Vzorcev plavajo v raztopini VS, zato prilagodite fokus mikroskopa, da ohranite neprekinjeno vizualizacijo med izpostavljanjem, v bližini pa imejte konico prenosne pipete, da zagotovite hiter prenos med kapljicami raztopine VS. Glejte sliko 6.
9. Ko je ekvibracija v ES končana, povlecite malo raztopine ES v prenosno pipeto in prenesite vzorce z minimalno količino kapljice ES v kapljico VS za 30 sekund.
10. Naložite in toplotno zatesnite konico CryoTip po navodilih (glejte sliko 7a):
 - Premaknite cevko kovinskega pokrovčka skupaj s konico CryoTip, da izpostavite drobne krhke konice.
 - Med rokovaljem s konico CryoTip in Hamiltonovo brizgo in med opazovanjem pod mikroskopom previdno aspirirajte majhno količino raztopine VS do oznake št. 1 na konici CryoTip.
 - Nadaljujte z opazovanjem pod mikroskopom in nežno aspirirajte vzorec z raztopino VS do oznake št. 2 na konici CryoTip.
 - Zdaj neposredno opazujte konico CryoTip in aspirirajte več raztopine VS do oznake št. 3.

- Vzorec mora biti med oznakama št. 2 in 3.
 - Toplotno zatesnite (zatesnitev št. 1) konico CryoTip pri (ali tik pod) oznaki št. 1, nato pa premaknite tulec pokrovska navzdol, da pokrijete in zaščitite krhko konico.
 - Previdno odstranite konico CryoTip z aspiracijskega orodja in adapterja, nato pa toplotno zatesnite (zatesnitev št. 2) na debelem koncu konice CryoTip nad oznako št. 4.
 - Potopite pokrito konico CryoTip neposredno v tekoči dušik (hlajenje s hitrostjo $-12.000\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) (glejte sliko 7b).
- Naložite in zatesnite slamico HSV po naslednjem postopku:
- Z uporabo mikropipete previdno odložite vzorec (vzorci) v kanal kapilarne palčke 1 mm od konca. Kapljica z vzorcem mora biti pod $0,5\text{ }\mu\text{l}$. Največ 2 oocita ali embria na posamezno kapilarno palčko.
 - Takoj vstavite kapilarno palčko in pripomoček za upravljanje v slamico ter potiskajte, dokler se pravokotni del pripomočka za upravljanje ne dotakne razširjenega konca slamice.
 - Rahlo stisnite slamico med palcem in kazalcem ter odstranite pripomoček za vstavljanje.
 - Slamico trdno držite na mestu in zatesnite odprti konec z uporabo tesnila SYMS.
 - Slamico držite s pinceto v območju upravljalne palčke.
 - Hitro potisnite celotno slamico navpično v LN_2 . Nežno premešajte slamico v LN_2 za nekaj sekund, da preprečite nastanek sloja izolacijskih zračnih mehurčkov okrog slamice.

Cryolock naložite tako:

- Z uporabo mikropipete previdno naložite največ 2 vzorca na vbočeno površino konice (ista stran kot logotip Cryolock) približno 3 mm ($1/8''$) od roba konice (za referenco je črna oznaka) in odstranite odvečno kriogeno zaščitno raztopino ter pustite čim manjšo količino vitrificacijskega sredstva ($\leq 1\text{ }\mu\text{l}$).
 - Možnost A: Takoj in pred potopitvijo Cryolock v LN_2 previdno vstavite konico v pokrovček in trdno privijte, tako da bo varno zaprto.
 - Možnost B: Takoj potopite konico in pokrovček pod LN_2 . Počakajte, da se zračni mehurčki prenehajo pojavljati, da omogočite ekvilibracijo. Previdno vstavite konico v pokrovček in trdno zaprite.
- OPOMBA: Možnost B ni odobrena za uporabo v ZDA.
- Hitro potopite Cryolock v tekoči dušik.
- OPOMBA: Vedno hranite Cryolock s pokrovčkom obrnjenim navzdol.
11. Vstavite vitrificirano konico CryoTip, slamico HSV ali Cryolock v potopljeno, z LN_2 napolnjeno kriogeno cevko ali čašo (na kriopalčki). S pokrovčkom zaprite kriep cevko (ali čašo) ali priključite obrnjeno navzdol na drugo nezaprto kriop cevko, da boste zavarovali vitrificirani pripomoček v tekočem dušiku.
 12. Premaknite rezervoar LN_2 v bližino kriozamrzovalnika LN_2 in prenesite kriopalčko z vsebino v kriozamrzovalnik za dolgotrajno shranjevanje.

B. EMBRII (PN do blastociste)

Protokol vitifikacije:

1. Aseptično dodajte eno $50\text{-}\mu\text{l}$ kapljico raztopine ES na obrnjeni pokrov petrijevke.
 2. Odstranite posodo s kulturo z embriji iz inkubatorja in preverite kakovost vzorcev pod mikroskopom. Če je mogoče, za vitifikacijo izberite le embrie najboljše kakovosti.
 3. Previdno prenesite vzorec (do dva sočasno) z minimalno količino medija iz posode s kulturo v kapljico raztopine ES in zaženite časovnik.
- Embriji se morajo počasi ekvilibrirati v kapljici raztopine ES s prostim padcem 6-10 minut.
- Opomba: Vzorec se bo skrčil in se nato postopno vračal v prvotno velikost, kar pomeni, da je ekvilibracija končana.
- OPOZORILO: Zmanjšajte izpostavljenost vzorca svetlobi zaradi ekvilibracije v kapljicah ES in VS.
4. Med časom ekvilibracije v ES:
 - pripravite eno $50\text{-}\mu\text{l}$ kapljico raztopine VS, kot je prikazano na sliki 8, in pripravite konico CryoTip, slamico HSV ali Cryolock za nalaganje.

Sledite zgoraj opisanemu protokolu (razdelek A – protokol vitifikacije oocitov [MII]) od koraka 9 do 12 za izpostavljanje raztopini VS, nalaganje konice CryoTip, slamice HSV ali pripomočka Cryolock, potapljanje v LN_2 in dolgoročno shranjevanje.

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 $2\text{ do }8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Če shranjujete po navodilih, so kompleti raztopin Vitrication Freeze 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 osebe, ki je usposobljeno za postopke asistirane 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.

Kot dodatni previdnostni ukrep med postopkom priprave priporočamo, da vsako konico Cryotip pozorno pregledate, ko jo vzamete iz embalaže. Pred uporabo je treba konice CryoTips pregledati pri ustreznih povečavi (40-kratni) glede morebitnih poškodb (npr. zloma konice ali razpok), do katerih bi lahko prišlo med transportom.

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 vitrifikacije na oocite in embrije 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

