

VitriFreeze™ VitriThaw™

(EN)

Medium for vitrification and thawing of human embryos

STERILE A

Sterilised by sterile filtration.
Doc. reference: FP09 I46 R01 B.5
Update: 29.01.2018

INTENDED USE

VitriFreeze and VitriThaw (VitriFreeze/Thaw) are a set of ready-to-use media for vitrification and thawing of human embryos.

For professional use only.

BACKGROUND

Vitrification which is preservation at extremely low temperatures without freezing can be more favourable than slow cooling (Kuleshova and Lopata, 2002). Due to variable results after application of slow-freezing methods for blastocysts, vitrification was introduced as an alternative approach.

The success rates of vitrification have been increased with the use of ultra-rapid vitrification procedures. Since several years, vitrification of blastocysts and embryos using different embryo carriers has resulted in many pregnancies.

In order to accomplish aseptic vitrification of blastocysts, the HSV High security vitrification kit (Cryo Bio System; available from FertiPro N.V.) was developed (Vanderzwalmen et al, 2000). The tip of the HSV straw is designed to hold the blastocysts in a very small volume of vitrification solution allowing fast cooling and thawing rates as compared to those achieved by immersion of sealed 0.25ml plastic straws into liquid nitrogen. An alternative, aseptic method is now also available in the shape of the VitriSafe straw.

COMPOSITION

VitriFreeze/Thaw are DMSO/ethylene glycol based vitrification media that also contain PBS, sucrose, Ficoll and human serum albumin (10-20g/Liter).
VitriFreeze/Thaw do not contain antibiotics.

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

VitriFreeze™ kit (VF_KIT1)

- » 1 vial of VitriFreeze Pre-incubation medium (5ml)
- » 1 vial of VitriFreeze Freezing medium 1 (1ml)
- » 1 vial of VitriFreeze Freezing medium 2 (1ml)

VitriThaw™ kit (VT_KIT1)

- » 1 vial of VitriThaw Thawing medium 1 (5ml)
- » 1 vial of VitriThaw Thawing medium 2 (1ml)
- » 1 vial of VitriThaw Thawing medium 3 (1ml)
- » 1 vial of VitriThaw Thawing medium 4 (1ml)

The media should be used in the order displayed above (the bottles may be in a different order in the kit) and can be used for approximately 4 procedures.

MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- » well dishes (e.g. Nunc 144 444)
- » freezing tank with liquid nitrogen
- » water bath (able to hold 37°C)
- » attenuated pipettes
- » forceps
- » vitrification device (HSV device, Cryo Bio System)
- » LAF-bench (ISO Class 5)
- » microscope
- » lab timer

VITRIFREEZE/THAW AND EMBRYOCULTURE

VitriFreeze/Thaw can be used in combination with FertiCult media (Flushing, IVF and GAIN medium) before freezing and after thawing.

PRODUCT SPECIFICATIONS

- » Chemical composition
- » pH between 7,20 – 7,40
- » Osmolality:
 - › VitriFreeze Pre-incubation medium: 270-290mOsm/kg
 - › VitriThaw Thawing medium 4: 270-290mOsm/kg
 - › VitriThaw Thawing medium 1: 805-850 mOsm/kg
 - › VitriThaw Thawing medium 2: 535-565 mOsm/kg
 - › VitriThaw Thawing medium 3: 405-435 mOsm/kg
- » Sterility: SAL 10⁻³
- » Endotoxins: < 0,25 EU/ml
- » Mouse Embryo Assay (blastocysts after 96h) ≥ 80%
- » Use of Ph Eur or USP grade products if applicable
- » The certificate of analysis and MSDS are available upon request

PRE-USE CHECKS

- » Do not use the product if it becomes discoloured, cloudy, or shows any evidence of microbial contamination.
- » Do not use the product if seal of the container is opened or defect when the product is delivered.

STORAGE INSTRUCTIONS

- » Store between 2-8°C.
- » Do not freeze before use.
- » Keep away from (sun)light.
- » The products can be used safely up to 7 days after opening, when sterile conditions are maintained and the products are stored at 2-8°C.
- » Do not use after expiry date.
- » Stable after transport (max. 5 days) at elevated temperature (≤ 37°C).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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 Pharmacopoeia specifications by established processes. Therefore, handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis.

Always wear protective clothing when handling specimens. Always work under strict hygienic conditions (e.g. LAF-bench ISO Class 5) to avoid possible contamination.

Only for the intended use. The long term safety of embryo vitrification on children born following this procedure is unknown.

METHOD

Ensure all media are well mixed before use. We strongly advice to read through all the steps of the vitrification/warming procedure before starting the procedure.

Preliminary steps

In a 4-well dish fill the first well with 300 µl of Pre-incubation medium, the second with VitriFreeze 1 (250 µl) and the third with VitriFreeze 2 solution (250 µl). Next open as many packs of HSV devices as will be required for the vitrification step, taking into account that 1 HSV device can hold up to 2 embryos. Conveniently place the separate parts of the HSV device on the workbench for easy access later in the procedure. Up to 5 vitrification cycles (of the same patient!) can be performed with one media set-up. Do not use the same media for different patients!

Freezing preparation

Transfer the embryos from the blastocyst cell culture medium in to each of the VitriFreeze solutions using the following scheme:

Stage	Pre-incub.	Vitri Freeze 1	Vitri Freeze 2	Temperature
Early Blastocyst Morulae	2'	2'	30"	Room temperature
Blastocyst – expanded Blastocyst	2'	3'	30"	37°C
Blastocyst – expanded Blastocyst + artificial shrinkage*	2'	2'	30"	Room temperature

* Before starting the vitrification procedure, in order to reduce the negative effect of the blastocoeal, expanded blastocysts should be collapsed by reducing artificially with a glass pipette the volume of the blastocoeal (Vanderzwalmen et al, 2002, Son et al., 2003 Hiraoka 2004).

Vitrification

- Using an attenuated pipette or an equally suitable device, deposit maximum 2 blastocysts in a volume of approximately 0,3µl of VitriFreeze 2, in the gutter of the tip of the vitrification straw.
- Place the vitrification straw in the outer sheath and seal it as indicated in the instructions for use of the HSV device.
- Plunge the sealed device into the liquid nitrogen.

Thawing

- In a 4-well dish, fill the first well with 1 ml VitriThaw Thawing medium 1, the second with Thawing 2 (250 - 300 µl), the third with Thawing 3 (250 - 300 µl) and the fourth with Thawing 4 (250 - 300 µl). Pre-heat the media at 37°C.
- Remove the vitrification straw from the outer sheath as indicated in the instructions for use of the HSV device.
- Immediately plunge the vitrification straw into pre-heated VitriThaw Thawing medium 1 (37°C) and leave in thawing 1 for 3 minutes.
- Transfer into VitriThaw Thawing medium 2 (37°C) and leave in this medium for 2 minutes.
- Transfer into VitriThaw Thawing medium 3 (37°C) and leave in this medium for 2 minutes.
- Finally transfer into VitriThaw Thawing medium 4 (37°C) and wash for at least 1 minute.
- Transfer into blastocyst culture medium for continued cell culture.

VitriFreeze™ VitriThaw™

(FR)

Milieux pour la vitrification et la décongélation d'embryons humains

STERILE A

Stérilisé par filtration stérile.
Référence du document : FP09 I46 R01 B.5
Mise à jour : 29.01.2018

UTILISATION PRÉVUE

VitriFreeze et VitriThaw (VitriFreeze/Thaw) sont des milieux prêts à l'emploi pour la vitrification et la décongélation d'embryons humains.

Réservé à l'usage professionnel.

CONTEXTE

La vitrification, qui est une méthode de conservation à températures extrêmement basses sans congélation, peut s'avérer plus favorable que le refroidissement lent (Kuleshova et Lopata, 2002). En raison de résultats variables après l'application de méthodes de refroidissement lent à des blastocystes, la vitrification a été introduite comme approche alternative.

Les taux de succès de la vitrification ont augmenté avec l'utilisation de procédures de vitrification ultra-rapides. Depuis plusieurs années, la vitrification de blastocystes et d'embryons à l'aide de différents dispositifs de transport d'embryons a abouti à de nombreuses grossesses. Le kit de vitrification haute sécurité HSV (Cryo Bio System; disponible chez FertiPro N.V.) a été mis au point (Vanderzwalmen et al, 2000) afin de réaliser une vitrification aseptique des blastocystes. L'extrémité de la paillette HSV est conçue pour contenir les blastocystes dans un très petit volume de solution de vitrification, ce qui permet des vitesses de refroidissement et de décongélation rapides par rapport à celles obtenues par immersion dans l'azote liquide de paillettes en plastique de 0,25ml fermées hermétiquement. Une autre méthode aseptique est désormais disponible avec la paillette VitriSafe.

COMPOSITION

VitriFreeze/Thaw sont des milieux de vitrification à base de DMSO/diéthylène glycol qui contiennent également du PBS, du saccharose, du Ficoll et de l'albumine sérique humaine (10-20g/litre).
Les milieux VitriFreeze/Thaw ne contiennent pas d'antibiotiques.

MATÉRIEL INCLUS DANS LE KIT

Kit VitriFreeze™ (VF_KIT1)

- » 1 flacon de milieu de pré-incubation VitriFreeze (5ml)
- » 1 flacon de milieu de congélation VitriFreeze 1 (1ml)
- » 1 flacon de milieu de congélation VitriFreeze 2 (1ml)

Kit VitriThaw™ (VT_KIT1)

- » 1 flacon de milieu de décongélation VitriThaw 1 (5ml)
- » 1 flacon de milieu de décongélation VitriThaw 2 (1ml)
- » 1 flacon de milieu de décongélation VitriThaw 3 (1ml)
- » 1 flacon de milieu de décongélation VitriThaw 4 (1ml)

Les milieux doivent être utilisés dans l'ordre indiqué ci-dessus (les bouteilles peuvent être présentée dans le coffret dans un ordre différent) et peuvent être utilisées pour environ 4 procédures.

MATÉRIEL NOT INCLUS DANS LE KIT

- » Boîtes à puits (par ex. Nunc 144 444)
- » Réservoir de congélation avec azote liquide
- » Bain-marie (pouvant maintenir le 37°C)
- » Pipettes atténuées
- » Pince
- » Dispositif de vitrification (dispositif de vitrification haute sécurité HSV, Cryo Bio System)
- » Poste de travail à flux d'air laminaire (classe ISO 5)
- » Microscope
- » Minuteur de laboratoire

VITRIFREEZE/THAW ET CULTURE D'EMBRYONS

Les milieux VitriFreeze/Thaw peuvent être utilisés en association avec les milieux FertiCult (Flushing, IVF et GAIN milieu) avant la congélation et après la décongélation.

SPÉCIFICATIONS DU PRODUIT

- » Composition chimique
- » pH entre 7,20 – 7,40
- » Osmolalité :
 - › Milieu de pré-incubation VitriFreeze : 270-290mOsm/kg
 - › Milieu de décongélation VitriThaw 4: 270-290mOsm/kg
 - › Milieu de décongélation VitriThaw 1: 805-850 mOsm/kg
 - › Milieu de décongélation VitriThaw 2: 535-565 mOsm/kg
 - › Milieu de décongélation VitriThaw 3: 405-435 mOsm/kg
- » Stérilité: SAL 10⁻³
- » Endotoxines: < 0,25 EU/ml
- » Test MEA de survivance embryonnaire (blastocytes après 96h) ≥ 80%
- » Utilisation de produits de la pharmacopée européenne (Ph Eur) ou américaine (USP) le cas échéant
- » Le certificat d'analyse et la fiche toxicologique sont disponibles sur demande.

VÉRIFICATIONS AVANT UTILISATION

- » Ne pas utiliser le produit s'il est décoloré, trouble ou en cas de suspicion de contamination microbienne.
- » Ne pas utiliser le produit si le scellé du contenant est rompu ou défectueux à la livraison du produit.

INSTRUCTIONS DE STOCKAGE

- » Stocker entre 2 et 8°C.
- » Ne pas congeler avant utilisation.
- » Tenir à l'abri de la lumière (du soleil).
- » Les produits peuvent être utilisés en toute sécurité jusqu'à 7 jours après ouverture si des conditions de stérilité sont respectées et si les produits sont conservés entre 2 et 8°C.
- » Ne pas utiliser une fois la date de péremption dépassée.
- » Stable après transport (maximum 5 jours) à température élevée (≤ 37°C).

AVERTISSEMENTS ET MESURES DE SÉCURITÉ

Les mesures standard pour prévenir les infections résultant de l'utilisation de médicaments préparés à partir de sang ou de plasma humains 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/élimination virale. Cependant, lorsque des médicaments préparés à partir de sang ou de plasma humains sont administrés, la possibilité de transmission d'agents infectieux ne peut être totalement exclue. Ceci s'applique également aux virus inconnus ou émergents et autres agents pathogènes. Aucune transmission de virus n'a été rapportée avec l'albumine fabriquée conformément aux spécifications de la Pharmacopée Européenne selon des procédés établis. Par conséquent, manipuler les spécimens dans les conditions prévues pour les agents susceptibles de transmettre le VIH ou l'hépatite. Toujours porter des vêtements de protection lors de la manipulation des spécimens. Toujours travailler dans des conditions d'hygiène strictes (par ex. poste de travail à flux d'air laminaire classe ISO 5) pour éviter une éventuelle contamination. Ne doit être utilisé que dans le but décrit ici. La sécurité à long terme de la vitrification d'embryons sur les enfants nés de cette procédure est inconnue.

MÉTHODES

Vérifier que tous les milieux soient bien mélangés avant utilisation. Nous vous recommandons fortement de bien lire toutes les étapes de la procédure de vitrification/réchauffage avant de commencer l'opération.

Étapes préliminaires

Dans une boîte à 4 puits, remplir le premier puits avec 300µl de milieu de pré-incubation, le deuxième avec la solution VitriFreeze 1 (250 µl) et le troisième avec la solution VitriFreeze 2 (250 µl). Ensuite, ouvrir autant de paquets de dispositifs HSV que nécessaire pour l'étape de vitrification, en tenant compte du fait qu'1 dispositif de vitrification haute sécurité peut contenir jusqu'à 2 embryons. Installer de façon pratique sur la paillasse les parties distinctes du dispositif HSV en vue d'un accès simple ultérieurement dans la procédure. Jusqu'à 5 cycles de vitrification (pour le même patient) peuvent être effectués avec une préparation de milieu. N'utilisez pas le même milieu pour plusieurs patients !

Préparation de la congélation

Transférer les embryons depuis le milieu de culture des blastocystes vers chacune des solutions VitriFreeze selon le plan suivant :

Stade	Pré-incub.	Vitri Freeze 1	Vitri Freeze 2	Température
Stade précoce de blastocyste, morula	2'	2'	30"	Température ambiante
Blastocyste – Blastocyste expansé	2'	3'	30"	37°C
Blastocyste – Blastocyste expansé + rétrécissement artificiel*	2'	2'	30"	Température ambiante

* Avant de débiter la procédure de vitrification, afin de réduire l'effet négatif du blastocœle, les blastocystes expansés doivent être effondrés par réduction artificielle avec une pipette en verre du volume du blastocœle (Vanderzwalmen et al, 2002, Son et al., 2003 Hiraoka 2004).

Vitrification

- À l'aide d'une pipette atténuée ou d'un dispositif équivalent, déposer 2 blastocystes maximum dans un volume d'approximativement 0,3µl de solution VitriFreeze 2, dans la gouttière de l'extrémité de la paillette de vitrification.
- Placer la paillette de vitrification dans la paillette externe et la fermer hermétiquement comme indiqué dans le mode d'emploi du dispositif HSV.
- Plonger le dispositif scellé dans l'azote liquide.

Décongélation

- Dans une boîte 4 puits, remplir le premier puit avec 1 ml de milieu VitriThaw 1, le second avec VitriThaw 2 (250 - 300 µl), le troisième avec VitriThaw 3 (250 - 300 µl) et le quatrième avec VitriThaw 4 (250 - 300 µl). Préchauffer le milieu à 37°C.
- Retirer la paillette de vitrification de la paillette externe comme indiqué dans le mode d'emploi du dispositif HSV.
- Plonger immédiatement la paillette de vitrification dans le milieu de décongélation VitriThaw 1 préchauffé (37°C) et la laisser dans la solution de décongélation 1 pendant 3 minutes.
- Transférer la paillette dans le milieu de décongélation VitriThaw 2 (37°C) et la laisser dans ce milieu pendant 2 minutes.
- Transférer la paillette dans le milieu de décongélation VitriThaw 3 (37°C) et la laisser dans ce milieu pendant 2 minutes.
- Transférer enfin la paillette dans le milieu de décongélation VitriThaw 4 (37°C) et la laver pendant au moins 1 minute.
- Transférer la paillette dans le milieu de culture des blastocystes pour la poursuite de la culture cellulaire.

VitriFreeze™ VitriThaw™

(DE)

Medium für Vitrifizierung und Auftauen menschlicher Embryonen

STERILE A

Sterilisiert mittels Sterilfiltration.
Dokument-Bezugsziffer: FP09 I46 R01 B.5
Aktualisierung: 29.01.2018

VERWENDUNGSZWECK

VitriFreeze und VitriThaw (VitriFreeze/Thaw) sind gebrauchsfertige Medien in einem Set für die Vitrifizierung und zum Auftauen menscheller Embryonen.

Nur für professionelle Nutzung.

HINTERGRUND

Vitrifizierung, d. h. die Konservierung bei sehr niedrigen Temperaturen ohne Einfrieren, kann gegenüber einer langsamen Senkung der Temperatur von Vorteil sein (Kuleshova und Lopata, 2002). Die Vitrifikation wurde aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse beim langsamen Einfrieren von Blastozysten als Alternativverfahren eingeführt. Durch Verwendung ultraschneller Vitrifizierungsverfahren konnten die Erfolgsquoten der Vitrifizierung erhöht werden. Die Vitrifizierung von Blastozyten und Embryonen unter Verwendung verschiedener Embryonenträger wird seit Jahren erfolgreich durchgeführt, wie zahlreiche Schwangerschaften belegen.

Zur Durchführung einer aseptischen Vitrifizierung von Blastozyten wurde das HSV High Security-Vitrifizierungskit (Cryo Bio System; von FertiPro N.V. erhältlich) entwickelt (Vanderzwalmen et al, 2000). Die Spitze des HSV-Halms ist so gestaltet, dass sich die Blastozysten dort in einem sehr geringen Volumen an Vitrifizierungslösung befinden. Dies erlaubt eine schnellere Abkühl- und Auftaueschwindigkeit als bei der Immersion versiegelter 0,25ml-Kunststoffhalme in Flüssigstickstoff. Mit dem VitriSafe-Halm ist nun auch eine aseptische Alternativmethode verfügbar.

ZUSAMMENSTELLUNG

VitriFreeze/Thaw sind Vitrifizierungsmedien auf DMSO/Ethylenglycolbasis, die außerdem PBS, Saccharose, Ficoll und Humanserumalbumin (10-20g/Liter) enthalten.
VitriFreeze/Thaw enthalten keine Antibiotika.

IM SET ENTHALTENES MATERIAL

VitriFreeze-kit (VF_KIT1)

- » 1 Ampulle mit VitriFreeze-Präinkubationsmedium (5ml)
- » 1 Ampulle mit VitriFreeze-Einfriermedium 1 (1ml)
- » 1 Ampulle mit VitriFreeze-Einfriermedium 2 (1ml)

VitriThaw-kit (VT_KIT1)

- » 1 Ampulle mit VitriThaw-Auftaumedium 1 (5ml)
- » 1 Ampulle mit VitriThaw-Auftaumedium 2 (1ml)
- » 1 Ampulle mit VitriThaw-Auftaumedium 3 (1ml)
- » 1 Ampulle mit VitriThaw-Auftaumedium 4 (1ml)

Die Medien sind in der vorstehend angegebenen Reihenfolge zu verwenden (die Flaschen können sich im Kit in einer anderen Reihenfolge befinden) und sind für ungefähr 4 Prozeduren verwendbar.

NICHT IM SET ENTHALTENES MATERIAL

- » Zellkulturschalen mit Kavitäten (z. B. Nunc 144 444)
- » Einfriertank mit Flüssigstickstoff
- » Wasserbad (eingestellt auf stabile 37°C)
- » attenuierte Pipetten
- » Pinzette
- » Vitrifizierungsvorrichtung (HSV-Vorrichtung, Cryo Bio System)
- » Arbeitsbank zum sterilen Arbeiten (Laminar Flow bzw. LAF Bench, ISO-Klasse 5)
- » Mikroskop
- » Stoppuhr

VITRIFREEZE/THAW UND EMBRYONKULTURMEDIUM

VitriFreeze/Thaw kann vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen mit FertiCult-Medien (Spülmedium, IVF-Medium und GAIN-Medium) kombiniert werden.

PRODUKTSPEZIFIKATIONEN

- » Chemische Zusammensetzung
- » pH-Wert: zwischen 7,20 – 7,40
- » Osmolarität:
 - › VitriFreeze-Präinkubationsmedium: 270-290 mOsm/kg
 - › VitriThaw-Auftaumedium 4: 270-290 mOsm/kg
 - › VitriThaw-Auftaumedium 1: 805-850 mOsm/kg
 - › VitriThaw-Auftaumedium 2: 535-565 mOsm/kg
 - › VitriThaw-Auftaumedium 3: 405-435 mOsm/kg
- » Sterilität: SAL 10⁻³
- » Endotoxine: < 0,25 EU/ml
- » Mouse Embryo Assay (Blastozysten nach 96h) ≥ 80%
- » Gebrauch von Ph Eur oder USP Grad Produkten gegebenenfalls
- » Analysebescheinigung und Sicherheitsdatenblatt sind auf Anfrage erhältlich

UNTERSUCHUNGEN VOR GEBRAUCH

- » Benutzen Sie das Produkt nicht mehr, wenn es verfärbt ist, wolkig oder wenn es irgendene Form von mikrobiell Kontamination aufweist.
- » Benutzen Sie das Produkt nicht, wenn bei Lieferung das Siegel beschädigt oder der Container offen oder defekt ist.

HINWEISE ZUR LAGERUNG

- » Lagern zwischen 2-8°C.
- » Vor Gebrauch nicht einfrieren.
- » Vor (Sonnen)licht schützen.
- » Die Produkte können nach dem Öffnen bis zu 7 Tage lang ohne Sicherheitseinbußen verwendet werden, sofern sterile Bedingungen gewahrt bleiben und die Produkte bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- » Nach dem Verfalldatum nicht mehr benutzen.
- » Nach dem Transport für maximal 5 Tage stabil bei Lagerung unter erhöhten Temperaturen (≤ 37°C).

