

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 defected 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 advise 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 (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 to each of the VitriFreeze solutions using the following scheme:

Stage	Pre-incub.	Vitri Freeze 1	Vitri Freeze 2	Temperature
Early Blastocyst	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 blastocole, expanded blastocysts should be collapsed by reducing artificially with a glass pipette the volume of the blastocole (Vanderzwalmen et al., 2002; Son et al., 2003 Hiraoka 2004).

Vitrification

1. 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.
2. Place the vitrification straw in the outer sheath and seal it as indicated in the instructions for use of the HSV device.
3. Plunge the sealed device into the liquid nitrogen.

Thawing

1. 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.
2. Remove the vitrification straw from the outer sheath as indicated in the instructions for use of the HSV device.
3. Immediately plunge the vitrification straw into pre-heated VitriThaw Thawing medium 1 (37°C) and leave in thawing 1 for 3 minutes.
4. Transfer into VitriThaw Thawing medium 2 (37°C) and leave in this medium for 2 minutes.
5. Transfer into VitriThaw Thawing medium 3 (37°C) and leave in this medium for 2 minutes.
6. Finally transfer into VitriThaw Thawing medium 4 (37°C) and wash for at least 1 minute.
7. Transfer into blastocyst culture medium for continued cell culture.

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 defected 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).

VitriFreeze™ VitriThaw™

FR

Milieux pour la vitrification et la décongélation d'embryons humains

STERILE A

Sterilisé 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.

Réservez 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/éthylène 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 présentées dans le coffret dans un ordre différent) et peuvent être utilisées pour environ 4 procédures.

MATÉRIEL NON INCLUS DANS LE KIT

- » Boîtes à puces (par ex. Nunc 144 444)
- » Réervoir de congélation avec azote liquide
- » Bain-marie (pouvant maintenir le 37°C)
- » Pipettes atténuatees
- » Pinces
- » Dispositif de vitrification (dispositif de vitrification haute sécurité HSV, Cryo Bio System)
- » Poste de travail à flux d'air laminaires (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.

SPECIFICATIONS 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
- » Stérité: SAL 10⁻³
- » Endotoxines: < 0,25 EU/ml
- » Test MEA de survie embryonnaire (blastocystes 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 si il est décoloré, trouble ou en cas de suspicion de contamination microbienne.
- » Ne pas utiliser le produit si le scellé du contenuant est rompu ou défectueux à la livraison du produit.

INSTRUCTIONS DE STOCKAGE

- » Stocker entre 2 et 8°C.
- » Ne pas conserver 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 donneurs 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 laminaires 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 puces, 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'il y ait suffisamment de dispositifs de vitrification pour 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 milieux. N'utilisez pas le même milieu pour plusieurs patients !

</

WARNUNGEN UND ANDERE VORSICHTSMASSNAHMEN

Standardmaßnahmen zur Prävention von Infektionen infolge der Verwendung von aus Humanblut oder -plasma hergestellten Medizinprodukten beinhalten die Spenderauswahl, das Screening einzelner Spenden und Plasmapools hinsichtlich bestimmter Infektionsmarker und die Durchführung wirksamer Schritte zur Inaktivierung/Eliminierung von Viren während der Herstellung. Dessen ungeachtet kann die Möglichkeit der Übertragung von Infektionserregern bei Verarbeitung von aus Humanblut oder -plasma hergestellten Medizinprodukten nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies gilt auch für die Möglichkeit der Übertragung unbekannter oder neuer Viren und anderer Krankheitserreger. Es liegen keine Berichte über bestätigter Virusübertragungen mit Albumin vor, das nach den Spezifikationen des Europäischen Arzneibuchs mit etablierten Verfahren hergestellt wurde. Alle Proben sind daher so zu handhaben, als ob sie HIV oder Hepatitis übertragen könnten.

Bei der Handhabung von Proben ist stets Schutzkleidung zu tragen. Stets unter streng aseptischen Bedingungen arbeiten (z. B. in einer Laminar-Flow-Arbeitsbank, ISO-Klasse 5), um eine mögliche Kontamination zu vermeiden.

Nur für den bestimmungsgemäßen Gebrauch. Die langfristige Unbedenklichkeit einer Vitrifizierung von Embryonen im Hinblick auf die später daraus geborenen Kinder ist unbekannt.

METHODEN

Alle Medien vor dem Gebrauch gut mischen. Es wird dringend empfohlen, sich vor Beginn des Verfahrens alle Schritte zur Durchführung der Vitrifizierung/Erwärzung durchzulesen.

Vorbereitungsschritte

In einer Zellkulturschale mit 4 Kavitäten die erste Kavität mit 300 µl Präinkubationsmedium, die zweite Kavität mit 250 µl Vitrifreeze 1- und die dritte mit 250 µl Vitrifreeze 2-Lösung füllen. Als Nächstes die für die Vitrifizierung benötigte Anzahl von Packungen mit HSV-Vorrichtungen öffnen (1 HSV-Vorrichtung kann bis zu 2 Embryonen aufnehmen). Die einzelnen Packungen mit HSV-Vorrichtungen auf dem Arbeitstisch bereitlegen, um sie später während des Verfahrens rasch griffbereit zu haben. Bis zu 5 Vitrifizierungszyklen (dieselben Patienten) können mit einer Medienzubereitung durchgeführt werden. Verwenden Sie nicht dieselben Medium für unterschiedliche Patienten!

Vorbereitung des Einfrierens

Die Embryonen aus dem Blastozysten zellkulturmedium in folgender Reihenfolge und Dauer in jede der Vitrifreeze-Lösungen überführen:

Stadium	Prä- incub.	Vtri Freeze 1	Vtri Freeze 2	Temperatur
Frühe Blastozyste, Morulae	2'	2'	30°	Raum- temperatur
Blastozyste – erweiter- te Blastozyste	2'	3'	30°	37°C
Blastozyste – erweiter- te Bi + artificiale Schrumpfung*	2'	2'	30°	Raum- temperatur

* Vor Beginn der Vitrifizierung sollte die Blastozole in erweiterten Blastozysten mitt Hilfe eines Glaspipette künstlich kolabbiert werden, um ihre unerwünschten Auswirkungen zu reduzieren (Vanderzwalmen et al., 2002; Son et al., 2003; Hiroaka 2004).

Vitrifizierung

1. Mit einer attenuierten Pipette oder einer ebenso geeigneten Vorrichtung maximal 2 Blastozysten in einem Volumen von ca. 0,3 µl Vitrifreeze 2 in die Rinne an der Spitze des Vitrifizierungshälmes geben.
2. Den Vitrifizierungshalm in die Außenhülse geben und versiegeln, wie es in den Anweisungen zur Verwendung der HSV-Vorrichtung beschrieben ist.
3. Die versiegelte Vorrichtung in den Flüssigkeitsschiff eintauchen.

Auftauen

1. Füllen Sie in einer 4-Well-Schale die erste Vertiefung mit 1 ml Auftaufmedium VtriThaw 1, die zweite mit Auftaufmedium VtriThaw 2 (250 - 300 µl), die dritte mit Auftaufmedium VtriThaw 3 (250 - 300 µl) und die vierte mit Auftaufmedium VtriThaw 4 (250 - 300 µl). Wärmen Sie die Medien bei 37°C vor.
2. Den Vitrifizierungshalm aus der Außenhülse nehmen, wie es in den Anweisungen zur Verwendung der HSV-Vorrichtung beschrieben ist.
3. Den Vitrifizierungshalm sofort in das bereits auf 37°C erwärmte VtriThaw-Auftaufmedium 1 geben und 1 bis 3 Minuten lang auftauen lassen.
4. In VtriThaw-Auftaufmedium 2 (37°C) überführen und 2 Minuten in diesem Medium lassen.
5. In VtriThaw-Auftaufmedium 3 (37°C) überführen und 2 Minuten in diesem Medium lassen.
6. Schließlich in VtriThaw-Auftaufmedium 4 (37°C) überführen und mindestens 1 Minute waschen.
7. Zur weiteren Zellkultur in Blastozysten Kulturmedium überführen.

VtriFreeze™ VtriThaw™

IT

Terreno per vetrificare e scongelare embrioni umani

STERILE A

Sterilizzato mediante filtrazione sterile.
Documento di riferimento: FP09 I46 R01 B.5
Aggiornamento: 29.01.2018

USO PREVISTO

VtriFreeze e VtriThaw (VtriFreeze/Thaw) sono un gruppo di terreni pronti all'uso per vetrificare e scongelare embrioni umani.

Per esclusivo uso professionale.

PREMessa

La vetrificazione che è la preservazione a temperature estremamente basse senza congelamento può essere più favorevole rispetto al raffreddamento lento (Kuleshova e Lopata, 2002). A causa dei risultati variabili in seguito all'applicazione di metodi di congelamento lento per le blastocisti, è stata introdotta la vetrificazione come approssimazione alternativa.

La percentuale di successo della vetrificazione è aumentata con l'uso delle procedure di vetrificazione ultrarapida. Da molti anni, la vetrificazione di blastocisti ed embrioni usando diversi carrier per embrioni ha consentito molte gravidanze. Per ottenere una vetrificazione aseptica di blastocisti, è stato sviluppato il kit di vetrificazione di sicurezza HSV High (Cryo Bio System; disponibile presso FertiPro N.V.) (Vanderzwalmen et al., 2000). La pianta della pallottola di HSV è stata progettata per tenere i blastocisti in un volume molto piccolo di soluzione di vetrificazione consentendo una velocità di raffreddamento e congelamento rapida rispetto a quanto si realizza mediante immersione della pallottola di plastica da 0,25ml in azoto liquido. Ora è anche disponibile un metodo aseptico, alternativo sotto forma della pallottola VtriSafe.

COMPOSIZIONE

I VtriFreeze/Thaw sono terreni per la vetrificazione basati su DMSO/etilen glicole che contengono anche PBS, sacarosio, Ficoll e albumina sierica umana (10-20g/Litro). VtriFreeze/Thaw non contiene antibiotici.

MATERIALE INCLUSO NEL KIT

Kit VtriFreeze™ (VF_KIT1)

- » 1 fiala di terreno da Pre-incubazione VtriFreeze 1 (5ml)
- » 1 fiala di terreno Congelamento VtriFreeze 1 (1ml)
- » 1 fiala di terreno Congelamento VtriFreeze 2 (1ml)

Kit VtriThaw™ (VT_KIT1)

- » 1 fiala di terreno Scongelamento VtriThaw 1 (5ml)
- » 1 fiala di terreno Scongelamento VtriThaw 2 (1ml)
- » 1 fiala di terreno Scongelamento VtriThaw 3 (1ml)
- » 1 fiala di terreno Scongelamento VtriThaw 4 (1ml)

I terreni devono essere usati secondo l'ordine sopra visualizzato. Nel kit, le bottiglie possono essere in un ordine diverso e possono essere utilizzate per circa 4 procedure.

MATERIALE NON COMPRESO NEL KIT

- » piastre a pozetti (e.g. Nunc 144 444)
- » serbatoio da congelamento con azoto liquido
- » bagno d'acqua (capacità di mantenimento fino a 37°C)
- » pipette assottigliate
- » pinze
- » strumento da vetrificazione (strumento HSV, Cryo Bio System)
- » LAF-bench (ISO Class 5)
- » microscopio
- » lab timer

VITRIFREEZE/THAW E EMBRIOCOLTURA

VtriFreeze/Thaw può essere usato insieme al terreno FertiCult (Flushing, IVF e GAIN terreno) prima del congelamento e dopo lo scongelamento.

SPECIFICHE DEL PRODOTTO

- » Composizione chimica
- » pH tra 7,20 – 7,40
- » Osmolalità:
 - » Terreno da Pre-incubazione VtriFreeze: 270-290mOsm/kg
 - » Terreno Scongelamento VtriThaw 4: 270-290mOsm/kg
 - » Terreno Scongelamento VtriThaw 1: 805-850 mOsm/kg
 - » Terreno Scongelamento VtriThaw 2: 535-565 mOsm/kg
 - » Terreno Scongelamento VtriThaw 3: 405-435 mOsm/kg
- » Sterilità: SAL 10³
- » Endotoxine: < 0,25 EU/ml
- » Test su embrioni murini (blastocisti dopo 96 ore) ≥ 80%
- » Utilizzo di prodotti secondo farmacopea Ph Eur o USP se applicabile
- » Il certificato delle analisi e MSDS sono disponibili su richiesta

VERIFICHE PRIMA DELL'USO

- » Non usare il prodotto se è colorito, opaco o se presenta qualsiasi segno di contaminazione microbica.
- » Non usare il prodotto se il sigillo del contenitore è aperto

o in presenza di difetti durante la consegna del prodotto.

ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE

- » Conservare a temperatura compresa tra i 2-8°C.
- » Non congelare prima dell'uso.
- » Mantenere lontano dalla luce (del sole).
- » I prodotti possono essere usati in modo sicuro entro 7 giorni dall'apertura, se sono state mantenute le condizioni di sterilità e i prodotti sono stati conservati a 2-8°C.
- » Non usare dopo la data di scadenza.
- » Ideale per il trasporto o lo scongelamento a breve termine (fino a 5 giorni a 37°C) a temperature elevate.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Le misure standard per prevenire le infezioni derivanti dall'uso di medicinali preparati dal sangue umano o dal plasma, includono la selezione di donatori, il monitoraggio delle donazioni individuali e dei pool plasmatici alla ricerca dei marcatori specifici di infezione e l'integrazione di fasi di produzione efficaci per inattivare/rimuovere i virus. Nonostante ciò, in corso di somministrazione di prodotti preparati da sangue umano o da plasma, non può essere totalmente esclusa la possibilità di trasmettere agenti infettivi. Questo si applica anche a virus o ad altri patogeni sconosciuti o emergenti. Non esistono rapporti che testimonino di trasmissioni di virus attraverso l'albumina prodotta conformità con le specifiche dalla Farmacopea europea mediante i procedimenti stabiliti. Pertanto, maneggiare tutti i campioni come fossero in grado di trasmettere HIV o epatite.

Indossare sempre guanti protettivi quando si maneggiano i campioni. Lavorare sempre rispettando rigorosamente le condizioni igieniche (e.s. LAF-bench ISO Classe 5) per evitare la possibile contaminazione.

Solo per l'uso previsto. La sicurezza a lungo termine della vetrificazione di embrioni sui bambini nati seguendo questa procedura non è nota.

METODI

Accertarsi che i terreni siano ben miscelati prima dell'uso. Prima di iniziare la procedura si raccomanda vivamente di leggere tutte le fasi della procedura di vetrificazione/riscaldamento.

Fasi preliminari

In una piastra a 4-pozzetti riempire il primo pozzetto con 300 µl di terreno da Pre-incubazione, il secondo con soluzione VtriFreeze 1 (250 µl) ed il terzo con VtriFreeze 2 (250 µl). Quindi aprire il numero di strumenti HSV richiesti per la fase di vetrificazione, tenendo conto che 1 strumento HSV può contenere fino a 2 embrioni. Può convenire disporre le parti separate dello strumento HSV sul banco di lavoro per facilitare il successivo accesso nella procedura.

Possono essere svolti fino a 5 cicli di vetrificazione (dello stesso paziente) con un terreno allestito. Non usare lo stesso terreno per pazienti diversi.

Preparazione congelamento

Trasferire gli embrioni dal terreno di coltura cellulare di blastocisti in ciascuna delle soluzioni VtriFreeze usando lo schema seguente:

Fase	Pre- incub.	Vtri Freeze 1	Vtri Freeze 2	Temperatura
Blastocisti precoce Morula	2'	2'	30°	Temperatura ambiente
Blastocisti – erweiter- te Blastocyste	2'	3'	30°	37°C
Blastocisti – erweiter- te Bi + artificiale Schrumpfung*	2'	2'	30°	Raum- temperatur

* Prima di iniziare la procedura di vetrificazione, per ridurre l'effetto negativo del blastocisto, le blastocisti espanso devono essere collapsate riducendo artificialmente il volume del blastocisto con una pipetta di vetro (Vanderzwalmen et al., 2002; Son et al., 2003; Hiroaka 2004).

Vetrificazione

1. Usando una pipetta assottigliata o altro strumento idoneo, depositare al massimo 2 blastocisti in un volume di circa 0,3 µl di VtriFreeze 2, nella scalinatura della punta della pallottola di vetrificazione.
2. Posizionare la pallottola di vetrificazione sul bordo esterno e sigillare come indicato nelle istruzioni per l'uso dello strumento HSV.
3. Immergere immediatamente la pallottola di vetrificazione nel terreno Scongelamento VtriThaw 1 pre-riscaldato.
4. Trasferire nel terreno Scongelamento VtriThaw 2 (37°C) e lasciare in questo terreno per 2 minuti.
5. Trasferire nel terreno Scongelamento VtriThaw 3 (37°C) e lasciare in questo terreno per 2 minuti.
6. Trasferire nel terreno Scongelamento VtriThaw 4 (37°C) e lavare per almeno 1 minuto.
7. Trasferire nel terreno di coltura di blastocisti per proseguire la coltura cellulare.

Scongelamento

1. In una piastra a 4 pozetti, riempire il primo con 1 ml di terreno VtriThaw 1, il secondo con VtriThaw 2 (250 - 300 µl), il terzo con VtriThaw 3 (250 - 300 µl) e il quarto con VtriThaw 4 (250 - 300 µl). Pre-riscaldare il terreno a 37°C.
2. Rimuovere la pallottola di vetrificazione dal bordo esterno come indicato nelle istruzioni per l'uso dello strumento HSV.
3. Immergere immediatamente la pallottola di vetrificazione nel terreno Scongelamento VtriThaw 1 pre-riscaldato.
4. Trasferire nel terreno Scongelamento VtriThaw 2 (37°C) e lasciare in questo terreno per 2 minuti.
5. Trasferire nel terreno Scongelamento VtriThaw 3 (37°C) e lasciare in questo terreno per 2 minuti.
6. Trasferire nel terreno Scongelamento VtriThaw 4 (37°C) e lavare per almeno 1 minuto.
7. Trasferire nel terreno di coltura di blastocisti per proseguire la coltura cellulare.

VtriFreeze™ VtriThaw™

ES

Medio para vetrificar y descongelar embriones humanos

STERILE A

Esterilizado por filtración estéril.
Referencia del documento: FP09 I46 R01 B.5
Actualización: 29.01.2018

USO ESPECÍFICO

VtriFreeze y VtriThaw (VtriFreeze/Thaw) son un conjunto de medios listos para usar para la vetrificación y la descongelación de embriones humanos.

Solo para uso profesional.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

La vetrificación, que es la preservación a temperaturas extremadamente bajas sin congelamiento, puede ser más favorable que el enfriamiento gradual (Kuleshova y Lopata, 2002). Debido a la diversidad de resultados obtenidos después de la aplicación de métodos de congelación gradual para blastocitos, se introduce la vetrificación como enfoque alternativo.

Los índices de satisfacción de la vetrificación aumentaron con el uso de procedimientos de vetrificación ultra rápidos. Hace ya varios años, la vetrificación de blastocitos y embriones con diferentes portadores de embriones tuvo como resultado gran cantidad de embarazos. A fin de lograr la vetrificación aseptica de blastocitos, se desarrolló el kit de vetrificación de alta velocidad HSV (Cryo Bio System; de FertiPro N.V.) (Vanderzwalmen et al., 2000). El extremo del tubo HSV se creó de modo que pueda mantener los blastocitos en un volumen muy pequeño de solución, lo que brinda tasas de enfriamiento y descongelación rápidas en comparación con las obtenidas mediante la inmersión de tubos plásticos de 0,25ml sellados en nitrógeno líquido. Como alternativa, se encuentra disponible un método aseptico en forma de tubo VtriSafe.

MÉTODOS

Asegúrese de que todos los medios están bien mezclados antes de utilizarlos. Recomendamos fervientemente leer todos los pasos del procedimiento de vetrificación/calentamiento antes de iniciar el proceso.

PASOS PRELIMINARES

En una placa de 4 pocillos, llene el primer pocillo con 300 µl del medio de preincubación, el segundo con 250 µl la solución VtriFreeze 1 y el tercero, con 250 µl VtriFreeze 2. A continuación, abra tantos paquetes