EN FR DE IT ES

Vitri Freeze ES™ Vitri Thaw ES™

VitriFreeze ES™ VitriThaw ES™ (EN)

Universal media for vitrification and warming of human embryos: zygote, cleavage stage, blastocyst

STERILE A

Sterilised by sterile filtration.
Doc. reference: FP09 I46 02 R01 D.7
Update: 04.03.2019

INTENDED USE

VitriFreeze ES™ and VitriThaw ES™ (VitriFreeze/Thaw ES™) are a set of ready-to-use media for vitrification and warming of human embryos. The Early stage vitrification kit and protocol are meant to be used with human embryos between 2PN and blastocyst stage.

For professional use only.

BACKGROUND

Vitrification is a cryopreservation procedure where a liquid solution is converted into an amorphous solid, free of any crystalline structure (Rall and Fahy 1985). This technique can be more favourable than slow cooling (Stehlik 2005).
Ultra-rapid vitrification of zygotes and embryos using 'open' carrier devices such as the 'Hemi-Straw' or 'VitriPlug', which allow direct contact with liquid nitrogen, has resulted in many births of healthy babies (Vanderzwalmen, 2003).
Due to European regulations defining medical safety requirements for cryopreservation of human cells, hermetically closed (aseptic) containers were developed which avoid direct contact between the embryo and the liquid nitrogen during cooling and long term storage. For this purpose the HSV (High Security Vitrification kit - Cryo Bio System) and the VitriSafe plug (MTG) were developed (Vanderzwalmen, 2009). Both devices consist of an inner straw that contains a gutter in which a small volume of cryoprotectant solution, with one or two embryos, is deposited. This inner straw is inserted into an outer, protective straw that is sealed before immersion into liquid nitrogen.
Due to thermo isolation however, the cooling rate in these devices is reduced compared to that in 'open' carrier devices. Therefore more cryoprotectant has to penetrate the cells in order to guarantee an intracellular state.
The VitriFreeze ES™ kit is designed to allow sufficient amounts of cryoprotectant to enter the embryo at different stages of development. During warming, VitriThaw ES™ kit is designed to gradually remove cryoprotectants.

COMPOSITION

VitriFreeze/Thaw ES™ are DMSO/Ethylene Glycol based vitrification media that also contain PBS, sucrose, Ficoll and human serum albumin (10-20g/liter). VitriFreeze/Thaw ES™ media do not contain antibiotics.

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

VitriFreeze ES™ kit (VF_KIT1_ES) contains one bottle each of the following media:
» 5ml VitriFreeze ES™ - Pre-incubation medium ("VPI")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 1 (5% DMSO - 5% EG) ("VF1")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 (10% DMSO - 10% EG) ("VF2")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 3 (20% DMSO - 20% EG) ("VF3")

VitriThaw ES™ kit (VT_KIT1_ES) contains one bottle each of the following media:
» 5ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 ("VT1")
» 3.2ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 ("VT2")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 3 ("VT3")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 4 ("VT4")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 5 ("VT5")

The media should be used in the order displayed above (the bottles may be in a different order in the box) and can be used for approximately 3-4 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, VitriSafe)
» LAF-bench (ISO Class 5), Microscope, Lab timer

VITRIFREEZE/THAW ES AND EMBRYOCULTURE

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

PRODUCT SPECIFICATIONS

» Chemical composition
» pH between 7,20 – 7,40
» Osmolality:
  › VPI: 270 – 295 mOsm/kg (release criteria: 270 – 290)
  › VT2: 805 – 865 mOsm/kg (release criteria: 805 – 850)
  › VT3: 535 – 565 mOsm/kg
  › VT4: 405 – 435 mOsm/kg
  › VT5: 270 – 295 mOsm/kg (release criteria: 270 – 290)
» 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.
» VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 may contain small salt precipitates which do not have an impact on product performance/safety.

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.

<u>Preliminary steps</u>

» Up to 5 vitrification cycles (of the same patient) can be performed with one media set-up prepared as indicated below. Do not use the same media for different patients!
» Open as many packs of vitrification devices as will be required for the vitrification step, taking into account the 1 device can hold 1 or 2 embryos (check the instructions for the device you are using). Conveniently place the separate parts of the device on the workbench for easy access later in the procedure.
» Cooling procedure: In a 4-well dish fill:
  250-300µl VPI
  250-300µl VF1
  250-300µl VF2
  250-300µl VF3
» Warming procedure: in a 6-well dish, fill:
  500-800µl VT1 (with closed device)
  250-300µl 1:1 dilution of VT1 and VT2 (with closed device)
  250-300µl VT2 (with closed device)
  500-800µl VT2 (with open device)
  250-300µl VT3
  250-300µl VT4
  250-300µl VT5

<u>Cooling protocol using a closed (aseptic) device</u>

Warm all media of the kit to room temperature (20-25°C) before use.

Development stage	VPI	VF1	VF2	VF3
Zygote-2-cell	2'	5'-10'	4'-5'	40"-60"
4-8 cell	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Morula	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Early Blastocyst	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Expanded blastocyst	2'	5'-10'	4'	40"-60"

Note: The complete process of placing the embryo in VitriFreeze ES™ Freezing medium 3, loading the embryo on the vitrification device, inserting the device in the outer straw (if applicable) and sealing should not take longer than 60 seconds before plunging the device into the liquid nitrogen. In case the process has taken longer than 60 seconds, make a note of this to analyze the effect on the results afterwards.

<u>Cooling protocol using an open device</u>

Warm all media of the kit to room temperature (20-25°C) before use.

Development stage	VPI	VF1	VF2	VF3
Zygote-2-cell	2'	2'	3'	30"-40"
4-8 cell	2'	2'	3'	30"-40"
Morula	2'	2'	3'	30"-40"
Early Blastocyst	2'	2'	3'	30"-40"
Expanded blastocyst*	2'	2'	4'	30"-40"

* If artificial shrinkage is used (Vanderzwalmen, 2002; Son,2003)

Note: The complete process of placing the embryo in VitriFreeze™ ES Freezing medium 3, loading the embryo on the vitrification device, inserting the device in the outer straw (if applicable) and sealing should not take longer than 60 seconds before plunging the device into the liquid nitrogen. In case the process has taken longer than 60 seconds, make a note of this to analyze the effect on the results afterwards.

<u>Warming protocol using a closed device</u>

Warm all media of the kit to room temperature (20-25°C) before use. (Alternatively and as indicated in previous version of the instructions for use, VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 can be warmed to 37°C.)

Development stage	VT1	VT1/2*	VT2	VT3	VT4	VT5
Zygote-2-cell	1'	1'	1'-2'	2'-4'	2'-4'	Wash for 1'-2' before transfer to culture medium
4-8 cell	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Early Blastocyst	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Expanded blastocyst	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	

* Mix 1 part VT1 with 1 part VT2

<u>Warming protocol using an open device</u>

Warm all media of the kit to room temperature (20-25°C) before use. (Alternatively and as indicated in previous version of the instructions for use, VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 can be warmed to 37°C.)

Development stage	VT2	VT3	VT4	VT5
Zygote-2-cell	2'	2'-4'	2'-4'	Wash for 1'-2' before transfer to culture medium
4-8 cell	2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	2'	2'-4'	2'-4'	
Early Blastocyst	2'	2'-4'	2'-4'	
Expanded blastocyst	2'	2'-4'	2'-4'	

VitriFreeze ES™ VitriThaw ES™ (FR)

Milieux universels pour la vitrification et le réchauffement d'embryons humains : zygote, blastomère, blastocyste

STERILE A

Stérilisée par filtration stérile.
Référence du document : FP09 I46 02 R01 D.7
Mise à jour : 04.03.2019

UTILISATION PRÉVUE

VitriFreeze ES™ et VitriThaw ES™ (VitriFreeze/Thaw ES™) sont des milieux pour la vitrification et le réchauffement d'embryons humains, prêt à l'emploi. Le kit de vitrification au stade précoce et le protocole sont destinés à être utilisés avec des embryons humains entre le stade 2PN et le stade blastocystaire.

Réservé à l'usage professionnel.

CONTEXTE

La vitrification est une méthode de cryoconservation au cours de laquelle une solution liquide est transformée en solide amorphe sans aucune structure cristalline (Rall et Fahy, 1985). Cette technique peut être plus favorable que le refroidissement lent (Stehlik 2005).
La vitrification ultra-rapide de zygotes et d'embryons en utilisant des dispositifs « ouverts » tels que « Hemi-Straw » ou « Vitriplug », qui permettent un contact direct avec l'azote liquide, a conduit à la naissance de nombreux bébés en bonne santé (Vanderzwalmen, 2003).
En raison des réglementations européennes définissant les exigences de sécurité médicale relatives à la cryoconservation des cellules humaines, des dispositifs fermés hermétiquement (aseptiques) ont été mis au point pour éviter le contact direct entre l'embryon et l'azote liquide durant le refroidissement et le stockage à long terme. Les dispositifs HSV (kit de vitrification haute sécurité – Cryo Bio System) et VitriSafe (MTG) ont été conçus à cette fin (Vanderzwalmen, 2009).
Ces deux dispositifs consistent en une paillette interne présentant une gouttière dans laquelle un petit volume de solution de cryoprotecteur est déposé avec un ou deux embryons. Cette paillette interne est insérée dans une paillette extérieure protectrice scellée avant immersion dans l'azote liquide.
Cependant, du fait de l'isolation thermique, la vitesse de refroidissement dans ces dispositifs est réduite par rapport à celle dans les dispositifs ouverts. Par conséquent, plus de cryoprotecteur doit pénétrer dans les cellules pour garantir l'état intracellulaire.
Le kit VitriFreeze ES™ est conçu pour permettre que des quantités suffisantes de cryoprotecteur entrent dans l'embryon à différents stades de développement. Durant le réchauffement, le kit VitriThaw ES™ permet d'ôter progressivement les cryoprotecteurs.

COMPOSITION

VitriFreeze/Thaw ES™ 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 ES™ ne contiennent pas d'antibiotiques.

MATÉRIEL INCLUS DANS LE KIT

Kit VitriFreeze ES™ (VF_KIT1_ES) contient un flacon de chacun des milieux suivants :
» 5ml VitriFreeze ES™ - Pre-incubation medium ("VPI")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 1 (5% DMSO - 5% EG) ("VF1")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 (10% DMSO - 10% EG) ("VF2")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 3 (20% DMSO - 20% EG) ("VF3")

Kit VitriThaw ES™ (VF_KIT1_ES) contient un flacon de chacun des milieux suivants :
» 5ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 ("VT1")
» 3.2ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 ("VT2")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 3 ("VT3")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 4 ("VT4")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 5 ("VT5")

Les milieux doivent être utilisés dans l'ordre indiqué ci-dessus (les flacons peuvent se trouver dans un ordre différent dans la boîte), le conditionnement permet de procéder à 3-4 procédures.

MATÉRIEL NON 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 HSV, VitriSafe)
» Poste de travail à flux d'air laminaire (classe ISO 5), microscope, minuterie de laboratoire

VITRIFREEZE/THAW ES ET CULTURE D'EMBRYONS

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

SPÉCIFICATIONS DU PRODUIT

» Composition chimique
» pH entre 7,20 – 7,40
» Osmolalité :
  › VPI : 270 – 295 mOsm/kg (critères de libération : 270 – 290)
  › VT2 : 805 – 865 mOsm/kg (critères de libération : 805 – 850)
  › VT3 : 535 – 565 mOsm/kg
  › VT4 : 405 – 435 mOsm/kg
  › VT5 : 270 – 295 mOsm/kg (critères de libération : 270 – 290)
» 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.
» VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 peut contenir un peu de sels, ces précipités n'ont pas d'impact sur les performances ou la sécurité du produit.

INSTRUCTIONS DE STOCKAGE

» Stocker entre 2 et 8°C.
» Ne pas congeler avant utilisation.
» Tenir à l'abri de la lumiere (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. The long term safety of embryo vitrification on children born following this procedure is unknown.

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.

<u>Étapes préliminaires</u>

» Jusqu'à 5 cycles de vitrification (du même patient) peuvent être effectués avec un kit de milieux, préparé comme indiqué ci-dessous. Ne pas utiliser les mêmes milieux pour différents patients!
» Ouvrir autant de paquets de dispositifs de vitrification, en tenant compte du fair qu'1 dispositif peut contenir 1 ou 2 embryons (consulter les instructions relatives au dispositif utilisé). Installer de façon pratique sur la paillasse les parties distinctes du dispositif en vue d'un accès simple ultérieurement dans la procédure.
» Procédure de refroidissement :
  dans une boîte à 4 puits, remplir:
  250-300µl VPI
  250-300µl VF1
  250-300µl VF2
  250-300µl VF3
» Procédure de réchauffement:
  dans une boîte à 6 puits, remplir:
  500-800µl VT1 (utilisant un dispositif fermé)
  250-300µl dilution 1:1 de VT1 et VT2 (utilisant un dispositif fermé)
  250-300µl VT2 (utilisant un dispositif fermé)
  500-800µl VT2 (utilisant un dispositif ouvert)
  250-300µl VT3
  250-300µl VT4
  250-300µl VT5

<u>Protocole de refroidissement en utilisant un dispositif fermé (aseptique)</u>

Ramener tous les milieux du kit à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Stade de développement	VPI	VF1	VF2	VF3
Zygote-2 cellules	2'	5'-10'	4'-5'	40"-60"
4-8 cellules	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Morula	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Blastocyste stade précoce	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Blastocyste expansé	2'	5'-10'	4'	40"-60"

Remarque : La procédure complète consistant à placer l'embryon dans VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, à charger l'embryon sur le dispositif de vitrification, à insérer le dispositif dans la paillette externe (le cas échéant) et à sceller cette dernière ne doit pas excéder 60 secondes avant de plonger le dispositif dans l'azote liquide. Si la procédure a duré plus de 60 secondes, en prendre note et en analyser l'effet sur les résultats ultérieurs.

<u>Protocole de refroidissement en utilisant un dispositif ouvert</u>

Ramener tous les milieux du kit à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.

Stade de développement	VPI	VF1	VF2	VF3
Zygote-2 cellules	2'	2'	3'	30"-40"
4-8 cellules	2'	2'	3'	30"-40"
Morula	2'	2'	3'	30"-40"
Blastocyste stade précoce	2'	2'	3'	30"-40"
Blastocyste expansé*	2'	2'	4'	30"-40"

* En cas de réduction de volume artificiel (Vanderzwalmen, 2002 ; Son, 2003)

Remarque : La procédure complète consistant à placer l'embryon dans VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, à charger l'embryon sur le dispositif de vitrification, à insérer le dispositif dans la paillette externe (le cas échéant) et à sceller cette dernière ne doit pas excéder 60 secondes avant de plonger le dispositif dans l'azote liquide. Si la procédure a duré plus de 60 secondes, en prendre note et en analyser l'effet sur les résultats ultérieurs.

<u>Protocole de réchauffement en utilisant un dispositif fermé</u>

Amener tous les milieux du kit à température ambiante (20-25°C) avant utilisation. (Alternativement et comme indiqué dans la version précédente du mode d'emploi, amener le milieu VitriThaw ES™ - Thawing 1 à 37°C.)

Stade de développement	VT1	VT1/2*	VT2	VT3	VT4	VT5
Zygote-2 cellules	1'	1'	1'-2'	2'-4'	2'-4'	Laver pendant 1'-2' avant transfert vers le milieu de culture
4-8 cellules	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocyste stade précoce	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocyste expansé	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	

* Mélanger 1 partie de VT1 avec 1 partie de VT2

<u>Protocole de réchauffement en utilisant un dispositif ouvert</u>

Amener tous les milieux du kit à température ambiante (20-25°C) avant utilisation. (Alternativement et comme indiqué dans la version précédente du mode d'emploi, amener le milieu VitriThaw ES™ - Thawing 2 à 37°C.)

Stade de développement	VT2	VT3	VT4	VT5
Zigote-2 cellules	2'	2'-4'	2'-4'	Laver pendant 1'-2' avant transfert vers le milieu de culture
4-8 cellules	2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocyste stade précoce	2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocyste expansé	2'	2'-4'	2'-4'	

VitriFreeze ES™ VitriThaw ES™ (DE)

Universalmedium für Vitrifizierung und Auftauen menschlicher Embryonen: Zygote, Furchungsstadium, Blastozyste

STERILE A

Sterilisiert mittels Sterilfiltration.
Dokument-Bezugsziffer: FP09 I46 02 R01 D.7
Aktualisierung: 04.03.2019

VERWENDUNGSZWECK

VitriFreeze ES™ und VitriThaw ES™ (VitriFreeze/Thaw ES™) sind gebrauchsfertige Medien in einem Set zur Vitrifizierung und zum Auftauen menschlicher Embryonen. Kit und Protokoll zur Vitrifizierung von Frühstadien sind für die Verwendung mit menschlichen Embryonen zwischen dem 2PN- und dem Blastozystenstadium bestimmt.

Nur zum professionellen Gebrauch.

HINTERGRUND

Vitrifizierung ist ein Kryokonservierungsverfahren, bei dem aus einer flüssigen Lösung eine amorphe, feste und kristallfreie Struktur wird (Rall and Fahy 1985). Diese Technik kann gegenüber langsamem Abkühlen Vorteile bringen (Stehlik 2005).
Die ultraschnelle Vitrifizierung von Zygoten und Embryonen mit „offenen" Trägervorrichtungen wie beispielsweise dem „Hemi-Straw" oder „VitriPlug", die den direkten Kontakt mit Flüssigstickstoff ermöglichen, hat zur Geburt vieler gesunder Babies geführt (Vanderzwalmen, 2003).
Aufgrund der in Europa geltenden Bestimmungen zur Festlegung medizinischer Sicherheitsanforderungen an die Kryokonservierung von menschlichen Zellen wurden hermetisch geschlossene (aseptische) Behältnisse entwickelt, die den direkten Kontakt zwischen Embryo und Flüssigstickstoff beim Abkühlen und der Langzeitaufbewahrung vermeiden. Zu diesem Zweck wurden das HSV (High Security Vitrification-Kit – Cryo Bio System) und der VitriSafe-Plug (MTG) entwickelt (Vanderzwalmen, 2009).
Beide Vorrichtungen bestehen innen aus einem Halm mit einer Rinne, in die eine kleine Menge an Kryoprotektionslösung mit einem Embryo oder zwei Embryonen deponiert wird. Dieser innere Halm wird in einen äußeren Schutzhalm eingeführt, welcher vor dem Eintauchen in Flüssigstickstoff versiegelt wird.
Aufgrund der thermischen Isolierung ist die Abkühlgeschwindigkeit in diesen Vorrichtung gegenüber der in „offenen" Trägervorrichtungen geringer. Es muss daher eine größere Menge Kryoprotektionsmittel in die Zellen hinein gelangen.
Das VitriFreeze ES™-Kit ist so konzipiert, dass in verschiedenen Entwicklungsstadien des Embryos ausreichende Mengen an Kryoprotektionsmittel in die Embryozellen hinein gelangen. Während des Auftauens bewirkt das VitriThaw ES™-Kit eine langsame Entfernung des Kryoprotektionsmittels.

ZUSAMMENSTELLUNG

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

IM SET ENTHALTENES MATERIAL

VitriFreeze ES™-Kit (VF_KIT1_ES) enthält je eine Flasche mit den folgenden Medien:
» 5ml VitriFreeze ES™ - Pre-incubation medium ("VPI")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 1 (5% DMSO - 5% EG) ("VF1")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 (10% DMSO - 10% EG) ("VF2")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 3 (20% DMSO - 20% EG) ("VF3")

VitriThaw ES™-Kit (VT_KIT1_ES) enthält je eine Flasche mit den folgenden Medien:
» 5ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 ("VT1")
» 3.2ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 ("VT2")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 3 ("VT3")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 4 ("VT4")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 5 ("VT5")

Die Medien sind in der vorstehend angegebenen Reihenfolge zu verwenden (möglicherweise haben die Flaschen in der Schachtel eine andere Reihenfolge) und genügen für ungefähr 3-4 Anwendungen.

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, VitriSafe)
» Arbeitsbank zum sterilen Arbeiten (Laminar Flow bzw. LAF Bench, ISO-Klasse 5), Mikroskop, Stoppuhr

VITRIFREEZE/THAW ES UND EMBRYONEN KULTURMEDIUM

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

PRODUKTSPEZIFIKATIONEN

» Chemische Zusammensetzung
» pH-Wert: zwischen 7,20 – 7,40
» Osmolarität:
  › VPI: 270 – 295 mOsm/kg (Einsetzungskriterium: 270 – 290)
  › VT2: 805 – 865 mOsm/kg (Einsetzungskriterium: 805 – 850)
  › VT3: 535 – 565 mOsm/kg
  › VT4: 405 – 435 mOsm/kg
  › VT5: 270 – 295 mOsm/kg (Einsetzungskriterium: 270 – 290)
» 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 irgendeine Form von mikrobiell Kontamination aufweist.
» Benutzen Sie das Produkt nicht, wenn bei Lieferung das Siegel beschädigt oder der Container offen oder defekt ist.
» VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 kann geringe Salzpräzipitate enthalten, die keine Auswirkung auf die Produktfunktion und -sicherheit haben.

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).

VitriFreeze ES™ VitriThaw ES™

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 Verabreichung 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 bestätigte 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/Erwärmung durchzulesen.

Vorbereitungsschritte

» Mit einem Medien-Setup, wie unten angegeben vorbereitet, können bis zu 5 Vitrifizierungszyklen (mit derselben Patientin) durchgeführt werden. Nicht für verschiedene Patientinnen dasselbe Medium verwenden!
» Als Nächstes die für die Vitrifizierung benötigte Anzahl von Packungen mit Vitrifizierungsvorrichtungen öffnen und dabei beachten, dass 1 Vorrichtung 1 oder 2 Embryonen aufnehmen kann (die Anweisungen für die jeweils verwendete Vorrichtungen auf dem Arbeitstisch bereitlegen, um sie später während des Verfahrens rasch griffbereit zu haben.
» Kühlverfahren:
In einer Zellkulturschale mit 4 Kavitäten, fullen:
250-300µl VPI
250-300µl VF1
250-300µl VF2
250-300µl VF3
» Erwärmungsverfahren:
In einer Zellkulturschale mit 6 Kavitäten, füllen:
500-800µl VT1 (einer geschlossenen Vorrichtung)
250-300µl 1:1-Verdünnung von VT1 und VT2
(einer geschlossenen Vorrichtung)
250-300µl VT2 (einer geschlossenen Vorrichtung)
500-800µl VT2 (einer offenen Vorrichtung)
250-300µl VT3
250-300µl VT4
250-300µl VT5

Abkühlprotokoll unter Verwendung einer geschlossenen (aseptischen) Vorrichtung

Alle Medien des Kits vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) erwärmen.

Entwicklungsstadium	VPI	VF1	VF2	VF3
Zygote-2-Zell-Stadium	2'	5'-10'	4'-5'	40"-60"
4-8-Zell-Stadium	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Morula	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Frühe Blastozyste	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Erweiterte Blastozyste	2'	5'-10'	4'	40"-60"

Hinweis: Der Vorgang des Platzierens des Embryos in VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, das Laden des Embryos auf die Vitrifizierungsvorrichtung, das Einsetzen der Vorrichtung in den Außenhalm (sofern vorhanden) und dessen Versiegelung sollten insgesamt nicht länger als 60 Sekunden dauern, bevor die Vorrichtung in den Flüssigstickstoff getaucht wird. Wenn der Vorgang länger als 60 Sekunden gedauert hat, ist dies zu protokollieren, um die Auswirkungen auf das spätere Ergebnis zu analysieren.

Abkühlprotokoll unter Verwendung einer offenen Vorrichtung

Alle Medien des Kits vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) erwärmen.

Entwicklungsstadium	VPI	VF1	VF2	VF3
Zygote-2-Zell-Stadium	2'	2'	3'	30"-40"
4-8-Zell-Stadium	2'	2'	3'	30"-40"
Morula	2'	2'	3'	30"-40"
Frühe Blastozyste	2'	2'	3'	30"-40"
Erweiterte Blastozyste*	2'	2'	4'	30"-40"

* Wenn künstliche Schrumpfung durchgeführt wird (Vanderzwalmen,2002; Son,2003)

Hinweis: Der Vorgang des Platzierens des Embryos in VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, das Laden des Embryos auf die Vitrifizierungsvorrichtung, das Einsetzen der Vorrichtung in den Außenhalm (sofern vorhanden) und dessen Versiegelung sollten insgesamt nicht länger als 60 Sekunden dauern, bevor die Vorrichtung in den Flüssigstickstoff getaucht wird. Wenn der Vorgang länger als 60 Sekunden gedauert hat, ist dies zu protokollieren, um die Auswirkungen auf das spätere Ergebnis zu analysieren.

Erwärmungsprotokoll unter Verwendung einer geschlossenen Vorrichtung

Vor Gebrauch alle Medien aus dem Kit auf Raumtemperatur (20-25°C) erwärmen. (Alternativ und wie in der vorherigen Version der Gebrauchsanweisung angegeben, können Sie das VitriThaw ES™ - Thawing 1 medium auf 37°C erwärmen.)

Entwicklungs-stadium	VT1	VT1/2*	VT2	VT3	VT4	VT5
Zygote-2-Zell-Stadium	1'	1'	1'-2'	2'-4'	2'-4'	Vor dem Überführen in Kulturmedium 1'-2' waschen
4-8-Zell-Stadium	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Frühe Blastozyste	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Erweiterte Blastozyste	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	

* 1 Teil VT1 mit 1 Teil VT2 mischen.

Erwärmungsprotokoll unter Verwendung einer offenen Vorrichtung

Vor Gebrauch alle Medien aus dem Kit auf Raumtemperatur (20-25°C) erwärmen. (Alternativ und wie in der vorherigen Version der Gebrauchsanweisung angegeben, können Sie das VitriThaw ES™ - Thawing 2 medium auf 37°C erwärmen.)

Entwicklungsstadium	VT2	VT3	VT4	VT5
Zygote-2-Zell-Stadium	2'	2'-4'	2'-4'	Vor dem Überführen in Kulturmedium 1'-2' waschen
4-8-Zell-Stadium	2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	2'	2'-4'	2'-4'	
Frühe Blastozyste	2'	2'-4'	2'-4'	
Erweiterte Blastozyste	2'	2'-4'	2'-4'	

VitriFreeze ES™ VitriThaw ES™ (IT)

Terreno universale per la vetrificazione ed il di embrioni umani: zigote, fase di scissione, blastocisti

STERILE A

Sterilizzata mediante filtrazione sterile.
Doc. riferimento: FP09 I46 02 R01 D.7
Aggiornamento: 04.03.2019

USO PREVISTO

VitriFreeze ES™ e VitriThaw ES™ (VitriFreeze/Thaw ES™) sono kit di terreni pronti all'uso per la vitrificazione e lo scongelamento di embrioni umani. E' previsto che il kit ed il protocollo di vetrificazione Early stage debbano essere usati con embrioni umani tra la fase a 2PN e la fase di blastocisti.

Per uso esclusivamente professionale.

PREMESSA

La vetrificazione è una procedura di criopreservazione dove una soluzione liquida viene convertita in solido amorfo, privo di qualsiasi struttura cristallina (Rall and Fahy 1985). Questa tecnica può essere più favorevole rispetto al raffreddamento lento (Stehlik 2005).
La vetrificazione ultra-rapida di zigoti ed embrioni usando strumenti carrier 'aperti' come 'Hemi-Straw' o 'VitriPlug', che permettono il contatto diretto con azoto liquido, ha permesso molte nascite di bambini sani (Vanderzwalmen, 2003).
In seguito alle normative europee che definiscono i requisiti di sicurezza medicale per la criopreservazione di cellule umane, sono stati sviluppati contenitori ermeticamente chiusi (asettici) che evitano il contatto diretto tra l'embrione e l'azoto liquido durante il raffreddamento e la conservazione a lungo termine. Per questo scopo sono stati sviluppati HSV (kit High Security Vitrification – Cryo Bio System) e VitriSafe plug (MTG) (Vanderzwalmen, 2009).
Entrambi gli strumenti sono composti da un dosatore interno che contiene una scanalatura in cui viene depositato un piccolo volume di soluzione crioprotettiva, con uno o due embrioni. Questo dosatore interno viene inserito in una paillette protettiva che viene sigillata prima dell'immersione nell'azoto liquido.
A causa dell'isolamento termico tuttavia, la velocità di raffreddamento in questi strumenti è ridotta rispetto a quella negli strumenti carrier "aperti". Pertanto si deve far penetrare nelle cellule più crioprotettivo allo scopo di garantire uno stato intracellulare.
Il kit VitriFreeze ES™ è progettato per consentire che entrino quantità sufficienti di crioprotettivo nell'embrione durante le diverse fasi dello sviluppo. Il kit VitriThaw ES™ è stato progettato per rimuovere gradualmente i crioprotettivi, durante il riscaldamento.

COMPOSIZIONE

I VitriFreeze/Thaw ES™ sono terreni per la vetrificazione basati su DMSO/Etilen Glicole che contengono anche PBS, saccarosio, Ficoll e albumina sierica umana (10-20g/litro). Il terreno VitriFreeze/Thaw ES™ non contiene antibiotici.

MATERIALE INCLUSO NEL KIT

Kit VitriFreeze ES™ (VF_KIT1_ES) contiene un flacone di ciascuno dei seguenti terreni di coltura:
» 5ml VitriFreeze ES™ - Pre-incubation medium ("VPI")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 1
(5% DMSO - 5% EG) ("VF1")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2
(10% DMSO - 10% EG) ("VF2")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 3
(20% DMSO - 20% EG) ("VF3")

Kit VitriThaw ES™ (VF_KIT1_ES) contiene un flacone di ciascuno dei seguenti terreni di coltura:
» 5ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 ("VT1")
» 3.2ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 ("VT2")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 3 ("VT3")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 4 ("VT4")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 5 ("VT5")

I terreni devono essere usati secondo l'ordine sopra visualizzato (i flaconi possono essere disposti in un ordine diverso nella confezione) e può essere utilizzato per circa 3-4 procedure.

MATERIALE NON COMPRESO NEL KIT

» Piastre a pozzetti (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, VitriSafe)
» LAF-bench (ISO Class 5), Microscopio, Lab timer

VITRIFREEZE/THAW ES E EMBRIOCOLTURA

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

SPECIFICHE DEL PRODOTTO

» Composizione chimica
» pH tra 7,20 – 7,40
» Osmolalità:
› VPI: 270 – 295 mOsm/kg (criteri di rilascio: 270 – 290)
› VT2: 805 – 865 mOsm/kg (criteri di rilascio: 805 – 850)
› VT3: 535 – 565 mOsm/kg
› VT4: 405 – 435 mOsm/kg
› VT5: 270 – 295 mOsm/kg (criteri di rilascio: 270 – 290)
» Sterilità: SAL 10^{-3}
» Endotossine: < 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 scolorito, 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.
» VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 può contenere piccoli precipitati di sale che non hanno un impatto sulle prestazioni / sicurezza 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.
» Idoneo per il trasporto o lo stoccaggio 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 in 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 indumenti protettivi durante la manipolazione dei 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

» Possono essere svolti fino a 5 cicli di vetrificazione (dello stesso paziente) con un terreno allestito, preparato come indicato di seguito. Non usare lo stesso terreno per pazienti diversi!
» Aprire il numero di strumenti di vetrificazione richiesti per la fase di vetrificazione, tenendo conto che 1 strumento può contenere 1 o 2 embrioni (controllare le istruzioni per lo strumento che si sta utilizzando). Conviene disporre le parti separate dello strumento sul banco di lavoro per facilitare il successivo accesso nella procedura.
» Procedura di raffreddamento:
In una piastra a 4-pozzetti riempire:
250-300µl VPI
250-300µl VF1
250-300µl VF2
250-300µl VF3
» Procedure di riscaldamento:
In una piastra con 6 pozzetti, riempire:
500-800µl VT1 (usando uno strumento chiuso)
250-300µl diluizione 1:1 di VT1 e VT2
(usando uno strumento chiuso)
250-300µl VT2 (usando uno strumento chiuso)
500-800µl VT2 (usando uno strumento aperto)
250-300µl VT3
250-300µl VT4
250-300µl VT5

Protocollo di raffreddamento usando uno strumento chiuso (asettico)

Riscaldare tutti i terreni del kit a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Fase di sviluppo	VPI	VF1	VF2	VF3
Zigote-2-cellule	2'	5'-10'	4'-5'	40"-60"
4-8 cellule	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Morula	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Blastocisti precoce	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Blastocisti espansa	2'	5'-10'	4'	40"-60"

Nota: Il procedimento completo di posizionamento dell'embrione nel VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, il caricamento dell' embrione nello strumento di vetrificazione, l'inserimento dello strumento nella paillette esterna (se possibile) e la sigillatura non devono durare più di 60 secondi prima dell'immersione dello strumento nell'azoto liquido. Nel caso in cui il procedimento abbia impiegato più di 60 secondi, prender nota del fatto per analizzare successivamente l'effetto sui risultati.

Protocollo di raffreddamento usando uno strumento aperto

Riscaldare tutti i terreni del kit a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Fase di sviluppo	VPI	VF1	VF2	VF3
Zigote-2-cellule	2'	2'	3'	30"-40"
4-8 cellule	2'	2'	3'	30"-40"
Morula	2'	2'	3'	30"-40"
Blastocisti precoce	2'	2'	3'	30"-40"
Blastocisti espansa*	2'	2'	4'	30"-40"

* Se è stata usata contrazione artificiale (Vanderzwalmen, 2002; Son,2003)

Nota: Il procedimento completo di posizionamento dell'embrione nel VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, il caricamento dell' embrione nello strumento di vetrificazione, l'inserimento dello strumento nella paillette esterna (se possibile) e la sigillatura non devono durare più di 60 secondi prima dell'immersione dello strumento nell'azoto liquido. Nel caso in cui il procedimento abbia impiegato più di 60 secondi, prender nota del fatto per analizzare successivamente l'effetto sui risultati.

Protocollo di riscaldamento usando uno strumento chiuso

Riscaldare tutti i terreni di colutura contenuti nel kit a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. In alternativae e come indicato nella versione precedente delle istruzioni per l'uso, il VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 può essere riscaldato a 37°C.

Fase di sviluppo	VT1	VT1/2*	VT2	VT3	VT4	VT5
Zigote-2-cellule	1'	1'	1'-2'	2'-4'	2'-4'	Lavare per 1'-2' prima di trasferire al terreno di coltura
4-8 cellule	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocisti precoce	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocisti espansa	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	

* Miscelare1 parte di VT1 con 1 parte di VT2

Protocollo di riscaldamento usando uno strumento aperto

Riscaldare tutti i terreni di colutura contenuti nel kit a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. (In alternativa e come indicato nella versione precedente delle istruzioni per l'uso, il terreno VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 può essere riscaldato a 37 ° C.).

Fase di sviluppo	VT2	VT3	VT4	VT5
Zigote-2-cellule	2'	2'-4'	2'-4'	Lavare per 1'-2' prima di trasferire al terreno di coltura
4-8 cellule	2'	2'-4'	2'-4'	
Morula	2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocisti precoce	2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocisti espansa	2'	2'-4'	2'-4'	

VitriFreeze ES™ VitriThaw ES™ (ES)

Medio universal de vitrificación y calentamiento de embriones humanos: cigoto, etapa de segmentación, blastocito

STERILE A

Esterilizado por filtración estéril.
Referencia del doc.: FP09 I46 02 R01 D.7
Actualización: 04.03.2019

USO ESPECÍFICO

VitriFreeze ES™ y VitriThaw ES™ (VitriFreeze/Thaw ES™) son un grupo de medios listos para utilizar para la vitrificación y el calentamiento de embriones humanos. El kit y el protocolo de vitrificación de la etapa inicial se diseñaron para utilizarlos con embriones humanos entre la etapa 2PN y de blastocito.

Solo para uso profesional.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

La vitrificación es un procedimiento de criopreservación en el que una solución líquida se transforma en un sólido amorfo, libre de toda estructura cristalina (Rall y Fahy 1985). Esta técnica puede ser más favorable que el enfriamiento gradual (Stehlik 2005).
La vitrificación ultra rápida de cigotos y embriones con la utilización de dispositivos huéspedes "abiertos", como 'Hemi-Straw' o 'VitriPlug', que permiten el contacto directo con el nitrógeno líquido, tuvo como resultado gran cantidad de embarazos con bebés saludables (Vanderzwalmen, 2003).
Debido a las reglamentaciones europeas que definen los requisitos de seguridad médica para la criopreservación de células humanas, se desarrollaron recipientes cerrados herméticamente (asépticos) que evitan el contacto directo entre el embrión y el nitrógeno líquido durante el enfriamiento y el almacenamiento a largo plazo. Con este fin, se desarrollaron el kit HSV (kit de vitrificación de alta seguridad, Cryo Bio System) y el tapón VitriSafe (MTG) (Vanderzwalmen, 2009).
Ambos dispositivos cuentan con un tubo interno que presenta un contenedor en el que se deposita un volumen pequeño de la solución crioprotectora, con uno o dos embriones. El tubo interno se coloca en un tubo externo protector que se sella antes de sumergirlo en el nitrógeno líquido.
No obstante, debido al aislamiento térmico, la tasa de enfriamiento de estos dispositivos se reduce en comparación con los dispositivos huéspedes "abiertos". Por lo tanto, debe penetrar mayor cantidad de crioprotector en las células para garantizar un estado intracelular.
El kit VitriFreeze ES™ se diseñó de modo que permita que ingresen cantidades suficientes de crioprotector en el embrión durante las diferentes etapas de desarrollo. Durante el calentamiento, el kit VitriFreeze ES™ elimina gradualmente los crioprotectores.

COMPOSICIÓN

VitriFreeze/Thaw ES™ son medios de vitrificación a base de glicol de etileno/DMSO que también contienen PBS, sacarosa, Ficoll y albúmina sérica humana (10-20g/litro). Los medios VitriFreeze/Thaw ES™ no contienen antibióticos.

MATERIAL QUE SE INCLUYE CON EL JUEGO

Kit VitriFreeze ES™ (VF_KIT1_ES) contiene un frasco de cada uno de los siguientes medios:
» 5ml VitriFreeze ES™ - Pre-incubation medium ("VPI")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 1
(5% DMSO - 5% EG) ("VF1")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2
(10% DMSO - 10% EG) ("VF2")
» 1ml VitriFreeze ES™ - Freezing medium 3
(20% DMSO - 20% EG) ("VF3")

Kit VitriThaw ES™ (VT_KIT1_ES) contiene un frasco de cada uno de los siguientes medios:
» 5ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 ("VT1")
» 3.2ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 ("VT2")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 3 ("VT3")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 4 ("VT4")
» 1ml VitriThaw ES™ - Thawing medium 5 ("VT5")

Los medios deben utilizarse en el orden mostrado anteriormente (las botellas pueden estar en diferente orden en la caja). Cada Kit puede ser utilizado para 3-4 procedimientos.

MATERIAL QUE NO SE INCLUYE CON EL JUEGO

» Placa de pocillos (por ejemplo, Nunc 144 444)
» Depósito de congelación con nitrógeno líquido
» Baño de agua (capaz de mantener 37°C)
» Pipetas atenuadas
» Fórceps
» Dispositivo de vitrificación (dispositivo HSV, VitriSafe)
» Estación de flujo de aire laminar (clase ISO 5), microscopio, temporizador

VITRIFREEZE/THAW ES Y CULTIVO DE EMBRIONES

VitriFreeze/Thaw ES™ puede utilizarse con un medio GAIN™/FertiCult™ (lavado, FIV) antes de la congelación y la descongelación.

ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

» Composición química
» pH entre 7,20 – 7,40
» Osmolalidad:
› VPI: 270 – 295 mOsm/kg
(criterios de lanzamiento: 270 – 290)
› VT2: 805 – 865 mOsm/kg
(criterios de lanzamiento: 805 – 850)
› VT3: 535 – 565 mOsm/kg
› VT4: 405 – 435 mOsm/kg
› VT5: 270 – 295 mOsm/kg
(criterios de lanzamiento: 270 – 290)
» Esterilidad: SAL 10^{-3}
» Endotoxinas: < 0,25 EU/ml
» Ensayo en embrión de ratón (blastocitos después de 96 hrs) ≥ 80%
» Uso de productos que se adecuan a los requisitos de Ph Eur (Farmacopea Europea) o USP (Farmacopea de Estados Unidos), en caso de ser necesario
» Puede obtenerse el certificado de análisis y las hojas de datos de seguridad del material a pedido.

PRUEBAS PREVIAS AL USO

» No utilice el producto si se descolora, adquiere una apariencia turbia o si muestra alguna evidencia de contaminación microbiana.
» No utilice el producto si el precinto del envase está abierto o presenta algún defecto cuando se entrega el producto.
» Este VitriFreeze ES™ - Freezing medium 2 puede contener pequeños precipitados de sal que no afectan al rendimiento/seguridad del producto.

INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

» Guarde el producto a una temperatura de 2 a 8°C.
» No enfríe el producto antes del uso.
» Aleje el producto de la luz (solar).
» Los productos pueden utilizarse de manera inocua hasta 7 días después de que se abran, cuando se mantienen las condiciones de esterilidad y los productos se almacenan a entre 2 y 8°C.
» No utilice el producto luego de la fecha de vencimiento.
» Indicado para ser transportado o almacenado en un periodo corto de tiempo, a elevadas temperaturas (periodos superiores a 5 días a 37°C).

ADVERTENCIAS Y PRECUACIONES

Las medidas estándares para prevenir infecciones causadas por el uso de productos medicinales preparados a partir de sangre o plasma humanos incluyen la selección de donantes, el análisis de las donaciones individuales o los grupos de plasma para buscar marcadores de infección y la incorporación de los pasos de fabricación efectivos para la inactivación/eliminación de virus. No obstante, cuando se administran productos medicinales preparados a partir de sangre o plasma humanos, no puede excluirse por completo la posibilidad de transmitir agentes infecciosos. Lo mismo ocurre con los virus desconocidos o emergentes y otros patógenos. No se informaron transmisiones de virus comprobadas con la albúmina fabricada según las especificaciones de Farmacopea Europea mediante los procesos establecidos. Por lo tanto, todos los especímenes deben manipularse como si fuesen capaces de transmitir VIH o hepatitis.
Siempre utilice prendas de protección al manipular muestras. Trabaje siempre en condiciones de higiene estrictas (por ejemplo, estaciones de flujo de aire laminar clase ISO 5) para evitar la posible contaminación.
Solo para uso específico. La seguridad a largo plazo de la vitrificación de embriones aplicada a niños nacidos a partir de este procedimiento se desconoce.

MÉTODOS

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

Pasos preliminares

» Pueden realizarse hasta 5 ciclos de vitrificación (del mismo paciente) con un kit de medios prepare come se indica abajo. No utilice los mismos medios con differentes pacientes.
» Abra tantos paquetes de dispositivos de vitrificación, teniendo en cuenta que el dispositivo 1 puede tener 1 o 2 embriones (verifique las instrucciones del dispositivo que está utilizando). Coloque convenientemente las partes separadas del dispositivo en el área de trabajo para poder acceder con facilidad más adelante durante el proceso.
» Procedimiento de refrigeración:
En una placa de 4 pocillos, llene:
250-300µl VPI
250-300µl VF1
250-300µl VF2
250-300µl VF3
» Procedimiento de calentamiento:
En una placa de 6 pocillos, llene:
500-800µl VT1 (con un dispositivo cerrado)
250-300µl dilución 1:1 de VT1 y VT2
(con un dispositivo cerrado)
250-300µl VT2 (con un dispositivo cerrado)
500-800µl VT2 (con un dispositivo abierto)
250-300µl VT3
250-300µl VT4
250-300µl VT5

Protocolo de enfriamiento con un dispositivo cerrado (aséptico)

Caliente todos los medios del kit a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarlos.

Etapa de desarrollo	VPI	VF1	VF2	VF3
Cigoto-2 células	2'	5'-10'	4'-5'	40"-60"
de 4 a 8 células	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Mórula	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Blastocito inicial	2'	5'-7'	4'	40"-60"
Blastocito expandido	2'	5'-10'	4'	40"-60"

Nota: El proceso completo de colocación del embrión en el VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, la colocación del embrión en el dispositivo de vitrificación, la inserción del dispositivo en el tubo externo (de ser pertinente) y el sellado no deben llevar más de 60 segundos antes de la inmersión del dispositivo en el nitrógeno líquido. En caso de que el proceso haya durado más de 60 segundos, regístrelo para analizar luego los efectos en los resultados.

Protocolo de enfriamiento con un dispositivo abierto

Caliente todos los medios del kit a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarlos.

Etapa de desarrollo	VPI	VF1	VF2	VF3
Cigoto-2 células	2'	2'	3'	30"-40"
de 4 a 8 células	2'	2'	3'	30"-40"
Mórula	2'	2'	3'	30"-40"
Blastocito inicial	2'	2'	3'	30"-40"
Blastocito expandido*	2'	2'	4'	30"-40"

* Si se utiliza encogimiento artificial (Vanderzwalmen, 2002; Son, 2003)

Nota: El proceso completo de colocación del embrión en el VitriFreeze ES™ Freezing 3 medium, la colocación del embrión en el dispositivo de vitrificación, la inserción del dispositivo en el tubo externo (de ser pertinente) y el sellado no deben llevar más de 60 segundos antes de la inmersión del dispositivo en el nitrógeno líquido. En caso de que el proceso haya durado más de 60 segundos, regístrelo para analizar luego los efectos en los resultados.

Protocolo de calentamiento con un dispositivo cerrado

Caliente todos los medios del kit a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarlos. (Alternativamente y como indicado en previa version del instructivo de uso, VitriThaw ES™ - Thawing medium 1 puede calentarse a 37°C.)

Etapa de des-arrollo	VT1	VT1/2*	VT2	VT3	VT4	VT5
Cigoto-2 células	1'	1'	1'-2'	2'-4'	2'-4'	Lávelo entre 1' y 2' antes de trasferirlo al medio de cultivo
de 4 a 8 células	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Mórula	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocito inicial	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocito expandido	1'-1'30"	1'-1'30"	1'-2'	2'-4'	2'-4'	

* Mezcle 1 parte de VT1 con 1 parte de VT2

Protocolo de enfriamiento con un dispositivo abierto

Caliente todos los medis del kit a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarlos. (Alternativamente y como indicado en previa version del instructivo de uso, VitriThaw ES™ - Thawing medium 2 puede calentarse a 37°C.)

Etapa de desarrollo	VT2	VT3	VT4	VT5
Cigoto-2 células	2'	2'-4'	2'-4'	Lávelo entre 1' y 2' antes de trasferirlo al medio de cultivo
de 4 a 8 células	2'	2'-4'	2'-4'	
Mórula	2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocito inicial	2'	2'-4'	2'-4'	
Blastocito expandido	2'	2'-4'	2'-4'	

EN FR DE IT ES

Vitri Freeze ES™ Vitri Thaw ES™

BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAPHIE LITERATURVERZEICHNIS / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFÍA

1. Rall W. et Fahy G. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, Nature, 313, 573
2. Stehlik E., Stehlik J., Katayama K., et al. (2005) Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. RBMonline, 11, 53-7
3. Son W.Y., Yoon S.H., Yoon H.J., Lee S.M. and Lim J.H. (2003) Pregnancy outcome following transfer of human blastocyst vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blasto coele, Hum. Reprod., 18, 137-139
4. Vanderzwalmen P., Ectors F., Grobet L. et al. (2009) Development of an aseptic vitrifi cation technique: application to blastocysts originating from infertile patients, egg donors and after in vitro maturation. RBMOnline, 19, 700-7
5. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C.H., Standaert V., Bollen N., van Roosendaal E., Vandervorst M., Schoysman R. and Zech H. (2003) Vitrification of human blastocyst with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. Hum. Reprod., 18(7), 1504-11
6. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C.H., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaïda T., Takahash K. and Schoysman R. (2002) Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effects of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification, Hum. Reprod., 17, 744-751
7. Ebner T., Vanderzwalmen P., Wirleitner B. (2015). Atlas of vitrified blastocyst in human Assisted reproduction. Cambridge University Press
8. Kaartinen, N., et al. (2016) The freezing method of cleavage stage embryos has no impact on the weight of the newborns. J Assist Reprod Genet, 33(3), 393-399

**TECHNICAL SUPPORT
ASSISTANCE TECHNIQUE
TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG
SUPPORTO TECNICO
AYUDA TÉCNICA**

CE 0344

FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Beernem – Belgium
Tel +32 (0)50 79 18 05
Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: www.fertipro.com
E-mail: info@fertipro.com