

Vitrification Freeze Kit (Vit Kit® - Freeze)

Catalog No. 90133-HSV Includes:

• Equilibration Solution - ES (white cap)	2 x 1 mL Vials
• Vitrification Solution - VS (blue cap)	2 x 1 mL Vials
• HSV Straw (Sterile)	2 x 4 ct. Packs

Catalog No. 90133-SO Includes:

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

For assisted reproductive procedures.

Für betreute fortpflanzungsverfahren.

Per tecniche di riproduzione assistita.

Para utilización en técnicas de reproducción asistida.

Pour les techniques de procréation médicalement assistée.

Para utilização em técnicas de reprodução assistida.

Για διαδικασίες επιβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Pro technologie asistované reprodukce.

Til brug ved assisteret reproduktion.

Avusteisiin lisääntymismenettelyihin.

Ar palīgīdzekļiem veicamām reproduktīvām procedūrām.

Voor geassisteerde voortplantingsprocedures.

Dla procedur wspomagających rozrodczość.

Pentru asistență privind procedurile de reproducere.

För procedurer för assisterad reproduktion.

Kasutamiseks reproduktiivse abi protseduurides.

Asszisztált reprodukciós eljárásokhoz.

Skirta pagalbinio apvaisinimo procedūroms.

Yardımla üreme prosedürleri için.

Symbols:

REF

Catalog Number

LOT

Lot Number

STERILE A

Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)



Expiration:
Year - Month - Day



Caution: See instructions for use



Storage Temperature



Manufacturer

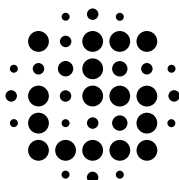


CE Mark

0050

EC REP

MPIE Schutweg 13a
5145 NP Waalwijk,
The Netherlands



IrvineScientific®

Figure 1:

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

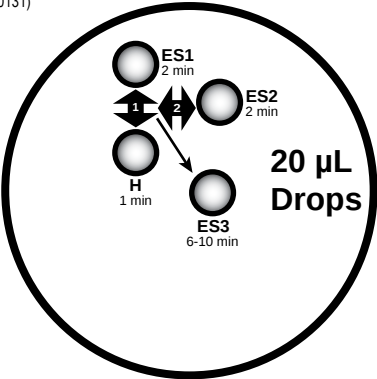


Figure 2:

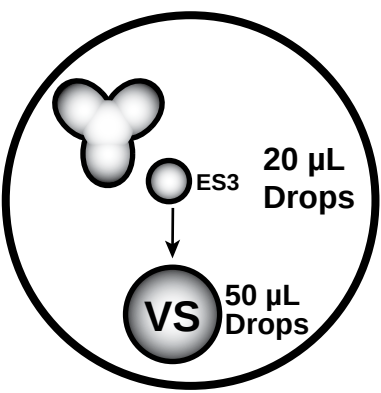


Figure 3:

Prepare CryoTip for loading

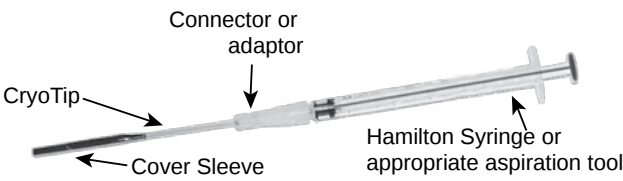


Figure 4:

Prepare HSV straw for Loading

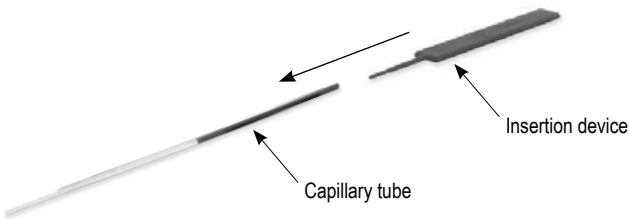


Figure 5:

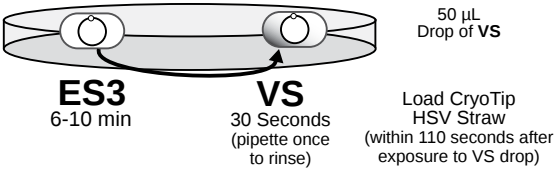


Figure 6a:

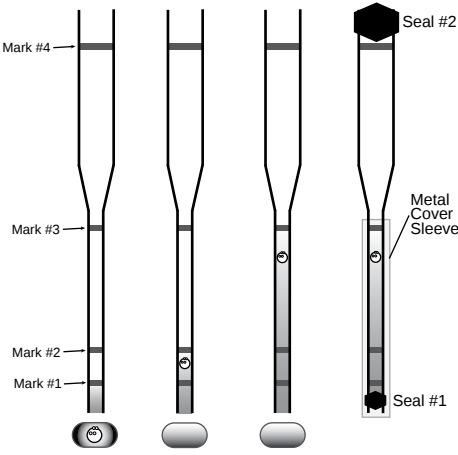


Figure 6b:

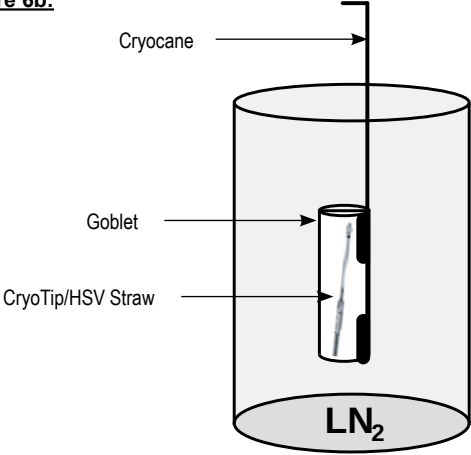
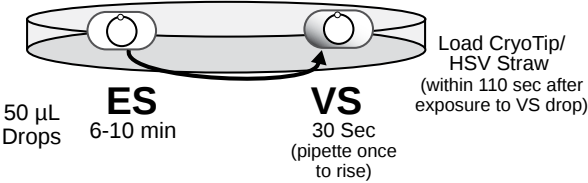


Figure 7:



INTENDED USE

Vit Kit® - Freeze is intended for use in assisted reproductive procedures for vitrification and storage of human oocytes (MI) and embryos (zygote to blastocyst). This kit is designed for use with Irvine Scientific's CryoTip® (Catalog No. 40709) or HSV Straw (Catalog No. 019921), and Vitrification Thaw Kit (Vit Kit® - Thaw) for optimal recovery of specimens.

PRODUCT DESCRIPTION

Equilibration Solution-ES is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate (35 µg/mL), 7.5% (v/v) of each DMSO and ethylene glycol and 20% (v/v) Dextran Serum Supplement.

Vitrification Solution-VS is a HEPES buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate (35 µg/mL), 15% (v/v) of each DMSO and ethylene glycol, 20% (v/v) Dextran Serum Supplement and 0.5 M sucrose.

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

QUALITY ASSURANCE

The solutions in Vit Kit-Freeze are membrane filtered and aseptically processed according to manufacturing procedures which have been validated to meet a sterility assurance level (SAL) of 10⁻³.

Each lot of Vit Kit-Freeze receives the following tests: Solutions and CryoTips.

- Endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) methodology
- Biocompatibility by Mouse Embryo Assay (one-cell)
- Sterility by the current USP Sterility Test <71>

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Irvine Scientific CryoTip® (Catalog No. 40709) or HSV Straw (Catalog No. 0019921)
- Irvine Scientific Connector (Catalog No. 40736) or other adaptor
- Sterile Petri Dishes (50 X 9 mm, Falcon 351006 or equivalent)
- Cryotubes (4.5 mL) or goblets or cryocanes
- Modified HTF - HEPES (Catalog #90126) culture medium supplemented with protein
- Disposable gloves
- Hamilton GASTIGHT® Syringe (50 µL, Catalog #80901) or other aspiration tool
- Transfer pipettes (pulled glass pipettes or micropipette tips with an inner tip diameter of ~200µm)
- Tweezers
- Impulse Heat Sealer
- SYMS Sealer for HSV Straw (Catalog No. 016296)
- Stopwatch or timer
- Liquid Nitrogen Reservoir (Dewar or Styrofoam container with lid, 1-2 L volume)
- Liquid Nitrogen (sufficient volume to achieve 4 inch depth in reservoir)

DIRECTIONS FOR USE

- Vit Kit-Freeze component requirements (per application):
- Equilibration Solution (ES):
60 µL for **Oocyte Vitrification Protocol**
Or
50 µL for **Embryo Vitrification Protocol**
 - Vitrification Solution (VS):
50 µL for Vitrification Protocol
 - 1 CryoTip or HSV Straw (**stores up to 2 specimens**)
 - 1 Connector

VITRIFICATION PROTOCOL:

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

- Bring the quantity to be used of ES and VS to room temperature (20-27° C). NOTE: Avoid bringing the entire vials of ES and VS to room temperature repeatedly when a partial of the solution is needed each time. It is better to aliquot the quantity to be used and return the vials to 2-8°C right after aliquoting. Modified HTF (HEPES) with protein is also required for oocyte vitrification protocol.
- Fill the liquid nitrogen reservoir with liquid nitrogen (sufficient to achieve a depth of 4 inches or to completely submerge cryotube on cane) and place close to microscope. Attach a cryotube or goblet (uncapped) to the bottom clamp of a cryocane and submerge in the liquid nitrogen in preparation for storage of the vitrified specimens.
- Determine the number of specimens to be vitrified.
- Label each sterile petri dish (or lid) and Cryo storage device with necessary information.
- Gently invert each vial of ES and VS twice to mix contents before use.
- Prepare dish with droplets of solutions for Vitrification Procedure as follows:
 - OOCYTE (MI) Vitrification Protocol:** NOTE: Refer to Section B for embryo vitrification protocol.
 - Aseptically dispense 20 µL drop of culture medium, Modified HTF - HEPES with protein, and ES in close proximity on an inverted lid of sterile petri dish as shown in **Figure 1**, and place the dish on the microscope stage:
 - one- 20 µL drop of Modified HTF (HEPES with protein)
 - three- 20 µL drops (60 µL total) of ES (ES1, ES2, ES3)
 - Remove the culture dish containing MI oocytes from the incubator and check the quality of the specimens under microscope. **Where possible, select only the best quality MI stage oocyte(s).** **CAUTION: Minimize the exposure of the specimen(s) to light during equilibration in the H, ES and VS drops.**
 - Transfer the oocyte (up to 2 at a time) with minimal volume of medium from the culture dish (in incubator) into the 20 µL drop of H for one minute.
 - Merge the drop of H to ES1 (See Fig. 1, arrow 1) with the tip of the transfer pipette and allow spontaneous mixing of the two solutions to occur for **2 minutes**.
 - Then merge the drop of ES2 (arrow 2) to the previously merged drops and leave for **2 minutes**.
 - Transfer the oocyte(s) with minimal volume of solution from merged drop to ES3 drop for **6-10 minutes**. **Note: equilibration of oocyte(s) in ES3 is complete when the thickness of the zona pellucida and perivitelline space is equal. The oocyte(s) will settle to the bottom of the drop within 3 minutes.**
 - During the equilibration time in ES3: Aseptically dispense one (1) 50 µL drop of VS 2 minutes prior to complete equilibration and prepare the cryotip (fig. 3) or HSV straw (fig. 4) for loading:**
 - CryoTip:** connecting to the Hamilton syringe or appropriate aspiration tool using a connector or adaptor to assure a tight seal. NOTE: Keep the metal cover sleeve over the fine pulled tip to protect it until ready to load specimens.
 - HSV Straw:** connecting the longer end of the blue plastic insertion device to the colored end of the handling rod.
 - The following steps (9-13) should be completed in 90-110 seconds. CAUTION: Exposure of specimens to VS should be limited to prevent cytotoxicity. Specimen(s) tend to float in VS, so adjust the focus through the microscope to maintain continuous visualization during exposure and keep the tip of the transfer pipette nearby to assure rapid transfer between VS drops. Refer to Figure 5.**
- After equilibration in ES is complete, draw up some ES into the transfer pipet and transfer the specimen(s) with minimal volume from the drop of ES into the **drop of VS for 30 seconds**.
- Load and heat seal the CryoTip as follows (See Figure 6a):**
 - Slide the metal cover sleeve up along the CryoTip to expose the fine fragile tip end.
 - Handling the CryoTip and Hamilton syringe while observing under the microscope, carefully aspirate a small volume of VS to the **Mark #1** on the CryoTip.
 - Continue observation under the microscope and gently aspirate the specimen with VS to the **Mark #2** on the CryoTip.
 - Now observe the CryoTip directly and aspirate more VS to the **Mark #3**.
 - Specimen must be located between **Mark #2 and Mark #3**.
 - Heat seal (**Seal #1**) the CryoTip on (or just below) **Mark #1**, and slide the cover sleeve back down to cover and protect the fine fragile tip.
 - Carefully remove the CryoTip from the aspiration tool and adaptor and then heat seal (**Seal #2**) at the thick end of the CryoTip above the **Mark #4**.
 - Plunge the covered CryoTip directly into liquid nitrogen (cooling at a rate of ~12,000° C/min) (See Figure 6b).

Load and seal the HSV straw as follows:

- Using a micropipette, carefully deposit the specimen(s) into the gutter of the capillary rod at 1 mm from the end. The drop holding the specimen(s) must be under 0.5 µL. Maximum of 2 oocytes or embryos for each capillary rod.
- Immediately place the capillary rod and handler into the straw and push until the rectangular portion of the handler comes in contact with the flared end of the straw.
- Slightly pinch the straw between your thumb and finger and remove the insertion device.
- While still holding the straw in place, seal the open end using a SYMS sealer.
- Hold the straw using tweezers in the area of the handling rod.
- Quickly plunge the entire straw into LN₂ vertically. Gently stir the straw in LN₂ for a few seconds so as to avoid formation of an isolating air bubble layer around the straw.
- Place the vitrified CryoTip or HSV straw into the submerged LN₂ filled cryotube or goblet (on the cryocane). Cap the cryotube (or goblet) or attach up-side-down with another uncapped cryotube in order to secure the vitrified CryoTip or HSV straw in liquid nitrogen.
- Move the LN₂ reservoir close to the LN₂ cryo-freezer and transfer the cryocane with contents to the cryo-freezer for long-term storage.

B. EMBRYOS (PN to Blastocyst)

Vitrification Protocol:

- Aseptically dispense one- 50 µL drop of ES on an inverted lid of Petri dish.
- Remove the culture dish with embryo(s) from the incubator and check the quality of the specimen(s) under microscope. **Where possible, select only the best quality embryo(s) for vitrification.**
- Carefully transfer the specimen (up to two at one time) with a minimal volume of medium from the culture dish to the drop of ES and start the timer. Embryos should equilibrate in the ES drop slowly by free-fall for 6-10 minutes. **Note: The specimen will shrink and then gradually return to its original size, which indicates that the equilibration is complete. CAUTION: Minimize the exposure of specimen(s) to light during equilibration in ES and VS drops.**
- During this equilibration time in ES:**
 - set up one-50 µL drop of VS solution as shown in Fig 7 and prepare the CryoTip or HSV Straw for loading.

Follow protocol as written above (Section A - Oocyte [MI] Vitrification Protocol) from steps 9 through 12 for exposure to VS solutions, loading of CryoTip or HSV Straw, plunging in LN₂ and long term storage.

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

STORAGE INSTRUCTIONS AND STABILITY

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

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

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

PRECAUTIONS AND WARNINGS

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

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

Do not use any vial of solution that shows evidence of particulate matter or cloudiness.

To avoid problems with contamination, handle using aseptic techniques.

Vitrification Freeze Kit Solutions contain the antibiotic gentamicin sulfate. Appropriate precautions should be taken to ensure that the patient is not sensitized to this antibiotic.

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

***Human blood derivatives used in the manufacture of this product has been tested by FDA licensed kits, and found to be non-reactive for the Hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibodies to Hepatitis C (HCV) and antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV). However, no test method offers complete assurance that products derived from human sources are noninfectious. Handle all Human blood derivatives as if it were capable of transmitting infection, using universal precautions. Donors of the source material have also been screened for risk of exposure to Cruetzfeldt-Jakob Disease (CJD).**

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

Caution: Federal (U.S.) law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

DEUTSCH

BESTIMMUNGSZWECK

Vit Kit® - Freeze ist für befruchtete Fortpflanzungsverfahren und ist zur Verglasung und zum Lager von menschlichen Oozyten (MI) und Embryos (Zygote bis zu Blastozyste) bestimmt. Dieses Kit ist für den Gebrauch mit dem CryoTip® (Katalog-Nr. 40709) oder HSV Straw (Katalog-Nr. 019921) und dem Vitrication Thaw Kit (Vit Kit® - Thaw) von Irvine Scientific für optimale Probenrückgewinnung vorgesehen.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Equilibration Solution-ES ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium-199. Die Lösung beinhaltet Gentamicinsulfat (35 µg/ml), 7,5% (v/v) von DMSO und auch von Ethylenglykol, und 20% (v/v) Dextran Serum Supplement*.

Vitrification Solution-VS ist eine HEPES-gepufferte Lösung von Medium-199. Die Lösung beinhaltet Gentamicinsulfat (35 µg/ml), 15% (v/v) von DMSO und auch von Ethylenglykol, 20% (v/v) Dextran Serum Supplement*, und 0,5 M Saccharose.

Diese zwei Lösungen sollen in Folge nach dem schrittweisen Verglasungsprotokoll für Microtropfen gebraucht werden.

QUALITÄTSSICHERUNG

Die Lösungen in Vit Kit-Freeze werden durch Membranfilter und aseptische Methoden veredelt. Diese Fertigungsverfahren sind bestätigt worden, ein Sterility Assurance Level (SAL) von 10⁻³ zu erfüllen.

Jedes Los von Vit Kit-Thaw wird durch Folgendes erprobt:

Lösungen und CryoTips:

- Endotoxin (durch LAL-Methoden)
- Biokompatibilität (durch Mouse Embryo Assay [eine Zelle])
- Sterilität (durch aktuellen USP Sterility Test [71])

Alle Ergebnisse werden auf einem Los-spezifischen Analysenzertifikat berichtet, das auf Antrag erhältlich ist.

NÖTIGE ABER NICHT BELIEFERTE MATERIALIEN

- Irvine Scientific CryoTip® (Katalog-Nr. 40709) oder HSV Straw (Katalog-Nr. 0019921)
- Irvine Scientific Konnektor (Katalog-Nr. 40736) oder anderer Adapter
- Sterile Petrischalen (50 x 9 mm, Falcon 351006 oder Äquivalent)
- Kryorohre (4.5 mL) oder Becher und Cryocanes (Tiefkühltemperaturstöcke)
- Modified HTF - HEPES (Katalog-Nr. 90126) Kulturmedium mit Protein
- Wegwerfbare Handschuhe
- Hamilton GASTIGHT® Spritze (50 µl, Katalog-Nr. 80901) oder anderes Aspirationswerkzeug
- Transferpipetten (Pipetten aus gezogenem Glas oder Micropipette-Düsen, dessen inneren Durchmesser ~200 µm ist)
- Pinzette
- Impulse Heat Sealer
- SYMS Sealer für HSV Straw (Katalog-Nr. 016296)
- Stoppuhr oder Zeitgeber
- Behälter für flüssigen Stickstoff (Dewar- oder Styropor-Behälter mit Deckel, Volumen von 1-2 l)
- Flüssiger Stickstoff (mit ausreichendem Volumen, eine Tiefe von 4 Zoll im Behälter zu erreichen)

GEBRAUCHSHINWEISE

Komponentenbedarfe des Vit Kit-Freeze (pro Einsatz):

- Equilibration Solution (ES)
 - 60 µl für Verglasungsprotokoll für Oozyten
 - Oder
 - 50 µl für **Verglasungsprotokoll für Embryos**
- Vitrification Solution (VS):
 - 50 µl für Verglasungsprotokoll
 - 1 CryoTip oder HSV Straw (**hält bis zu 2 Mustern**)
 - 1 Anschlussstück

VERGLASUNGSPROTOKOLL:

HINWEIS: Verfahren sollen bei Raumtemperatur (20-27°C) ausgeführt werden. Gebrauchen Sie **KEINEN** erhitzten Objektträger für die folgenden Verfahren. **VORSICHT:** Minimieren Sie Kontakt (des Musters) mit Licht während der Äquilibration in ES- und VS-Lösungen.

- Die zu verwendende Menge Äquilibrationlösung (ES) oder Vitrifizierungslösung (VS) auf Raumtemperatur bringen (20-27 °C). **HINWEIS:** ES sollte vermieden werden, die gesamten Röhrchen mit ES und VS wiederholt auf Raumtemperatur zu bringen, wenn jedes Mal nur ein Teil der Lösung benötigt wird. ES ist besser, die zu verwendende Menge zu aliquotieren und die Röhrchen unmittelbar danach wieder auf 2-8 °C zu kühlen. Modified HTF (HEPES) mit Protein ist auch fürs Verglasungsprotokoll für Oozyten nötig.
- Füllen Sie den Behälter für flüssigen Stickstoff mit flüssigem Stickstoff (mit ausreichendem Volumen, eine Tiefe von 4 Zoll zu erreichen, oder dass ein Kryorohr auf einem Cryocane untertaucht werden kann). Stellen Sie den Behälter beim Mikroskop. Schliessen Sie ein Kryorohr oder einen Becher (entdeckelt) auf die untere Klammer eines Cryocanes an und untertauchen Sie beide in den flüssigen Stickstoff, in Vorbereitung für das Lager der verglasten Muster.
- Bestimmen Sie die Zahl der Muster, die zu verglasen sind.
- Jede sterile Petrischale (oder Deckel) und jede Kryovorrichtung für die Aufbewahrung mit den erforderlichen Informationen beschriften.
- Kehren Sie behutsam jedes Fläschchen von ES und VS zweimal um, um den Inhalt vor dem Gebrauch zu mischen.
- Bereiten Sie die Schale mit Tropfen von den Lösungen fürs Verglasungsprotokoll, wie hier angewiesen:

A. Verglasungsprotokoll für OOZYTEN (MI)

HINWEIS: Sehen Sie *Teil B* für Verglasungsprotokoll für Embryos.

- Mit aseptischer Technik 20-µl-Tropfen des Kulturmediums, Modified HTF - HEPES mit Protein, und ES, wie in **Abbildung 1** gezeigt, in unmittelbarer Nähe auf einen umgekehrten Deckel einer sterilen Petrischale geben und die Schale auf den Objektisch platzieren:
 - ein 20-µl-Tropfen Modified HTF (HEPES mit Protein)
 - drei- 20 µl Tropfen (60 µl im Total) ES (ES1, ES2, ES3)
- Nehmen Sie aus dem Brutschrank die Kulturschale, die MI Oozyten beinhaltet. Prüfen Sie unter Mikroskop die Qualität der Muster. **Wenn möglich, wählen Sie nur die Oozyten (MI) von höchster Qualität. VORSICHT: Minimieren Sie Kontakt (des Musters) mit Licht während der Äquilibration in den H-, ES- und VS-Tropfen.**
- Versetzen Sie mit minimalem Volumen Nährboden die **Oozyten** (bis zu 2 jeweils) von der Petrischale (im Brutschrank) in den 20 µl Tropfen Modified HTF - HEPES.
- Mischen Sie den Tropfen von H mit ES1 (sehen Sie Fig. 1, Pfeil 1). Gebrauchen Sie die Düse einer Transferpipette und ermöglichen Sie für **2 Minuten** die spontane Mischung der zwei Lösungen.
- Dann den Tropfen ES2 (Pfeil 2) mit den zuvor kombinierten Tropfen kombinieren und **2 Minuten** stehen lassen.
- Die Oozte(n) mit minimaler Menge der Lösung des Tropfengemisches auf den ES3-Tropfen übertragen und **6-10 Minuten** warten. **Hinweis: Äquilibration des (der) Oozyten in ES3 ist fertig, wenn die Dicke der Zona Pellucida und die Dicke des perivitellinen Raums gleich sind. Der (die) Oozyt(en) wird (werden) innerhalb von 3 Minuten auf das untere Ende des Tropfen niederlassen.**
- Während der Äquilibrationszeit in ES3:**
 - Einen (1) VS-Tropfen (50 µL) mit aseptischer Technik 2 Minuten vor Beendigung der Äquilibration übertragen und den CryoTip (**Abb.3**) bzw. HSV Straw (**Abb.4**) zur Beladung vorbereiten:
 - CryoTip:** Mit einem Konnektor oder Adapter an die Hamilton-Spritze oder ein angemessenes Aspirationswerkzeug anschließen, um eine dichte Versiegelung sicherzustellen. **HINWEIS:** Die Metallabdeckung auf der dünnen Spitze belassen, um sie bis zum Laden der Proben zu schützen.
 - HSV Straw:** Das längere Ende der blauen Kunststoff-Einführungsvorrichtung an das farbige Ende des Handhabungsstabs anschließen.
- Die Folgenden Schritte (9-13) sollen in 90-110 Sekunden ausgeführt werden. VORSICHT:** Kontakt (der Muster) mit VS soll beschränkt sein, um Zytotoxizität zu verhindern. Muster neigen dazu, in VS zu schweben; deshalb sollen Sie die Bildschärfe so einstellen, dass Sie

durchgehende Visualisierung während des Kontakts halten können. Behalten Sie auch die Düse der Transferpipette nahe bei, um schnelle Versetzung zwischen VS-Tropfen zu sichern. Sehen Sie Figur 5.

- Nachdem die Äquilibration in ES fertig ist, ziehen Sie ein Bisschen ES in die Transferpipette und versetzen Sie für **30 Sekunden** mit minimalem Volumen das (die) Muster vom ES-Tropfen ins des **ersten Tropfens VS**.
- Den CryoTip folgendermaßen laden und hitzeversiegeln (siehe Abbildung 6a):**
 - Gleiten Sie die metallische Hülse nach oben, die CryoTip entlang, um das zerbrechliche Ende der Düse aufzudecken
 - Während Sie die CryoTip und Spritze unter Mikroskop beobachten, aspirieren Sie ein kleines Volumen VS bis zum **Zeichen #1** auf der CryoTip.
 - Während Sie das Verfahren noch unter Mikroskop beobachten, aspirieren Sie das Muster mit VS bis zum **Zeichen #2** auf der CryoTip.
 - Jetzt beobachten Sie die CryoTip direkt und aspirieren Sie mehr VS bis zum **Zeichen #3**.
 - Verschliessen Sie die CryoTip mit Hitze (**Verschluss #1**) auf (oder gerade unter) **Zeichen #1**, und gleiten Sie die Hülse wieder nach unten, um das zerbrechliche Ende der Düse zu schützen.
 - Den CryoTip vorsichtig aus Aspirationswerkzeug und Adapter entfernen und dann am dicken Ende des CryoTip oberhalb von **Markierung Nr. 4** hitzeversiegeln (**Versiegelung Nr. 2**).
 - Tauchen Sie die bedeckte flüssigen Stickstoff unter. (Der Stickstoff soll eine Kühlungsmaß von 12.000°C/min beinhalten) (sehen Sie Figur 6b).

Den HSV Straw folgendermaßen laden und versiegeln:

- Mit einer Mikropipette die Probe(n) vorsichtig 1 mm vom Ende entfernt in die Rinne des Kapillarstabes einbringen. Der Tropfen mit der Probe muss weniger als 0,5 µl betragen. Maximal 2 Oozyten oder Embryos für jeden Kapillarstab.
- Den Kapillarstab und die Handhabungsvorrichtung sofort in den Straw platzieren und eindringen, bis der rechteckige Teil der Handhabungsvorrichtung das ausgestellte Ende des Straws berührt.
- Den Straw zwischen Daumen und Zeigefinger zusammendrücken und die Einführungsvorrichtung entfernen.
- Den Straw weiterhin festhalten und das offene Ende mit einem SYMS-Versiegler versiegeln.
- Den Straw mit einer Pinzette im Bereich des Handhabungsstabes festhalten.
- Den gesamten Straw rasch vertikal in LN₂ eintauchen. Den Straw für einige Sekunden vorsichtig in LN₂ führen, um die Bildung einer isolierenden Luftblassenschicht um den Straw herum zu vermeiden.
- Den vitrifizierten CryoTip oder HSV Straw in das eingetauchte, mit LN₂ gefüllte Kryoröhrchen oder den Becher platzieren (auf dem Cryocane). Das Kryoröhrchen (oder den Becher) verschließen oder umgekehrt an ein anderes unverschlossenes Kryoröhrchen anschließen, um den vitrifizierten CryoTip oder HSV Straw in Flüssigstickstoff zu sichern.
- Bewegen Sie den LN₂ Behälter beim LN₂ Kryokühlschrank und versetzen Sie den Cryocane mit Inhalt in den Kryo-Kühlschrank für langfristiges Lager.

B. Verglasungsprotokoll für EMBRYOS

(PN bis zu Blastozysten):

- Verteilen Sie aseptisch einen- 50 µl Tropfen ES auf einen umgekehrten Deckel einer Petrischale.
- Nehmen Sie die Kulturschale mit Embryo(s) aus dem Brutschrank und prüfen Sie unter Mikroskop die Qualität des Musters. **Wenn möglich, wählen Sie für Verglasung nur den (die) Embryo(s) von höchster Qualität.**
- Versetzen Sie behutsam, mit minimalem Volumen Nährboden, das Muster (bis zu zwei jeweils) von der Kulturschale zum des ES-Tropfen. Starten Sie den Zeitgeber. Embryos sollen für 6-10 Minuten langsam durch freien Fall im ES-Tropfen äquilibrieren. **Hinweis: Das Muster wird schrumpfen und dann allmählich zurück zur ursprünglichen Größe vergrößern. Dies zeigt, dass die Äquilibration fertig ist. VORSICHT:** Minimieren Sie Kontakt (des Musters) mit Licht während der Äquilibration in ES- und VS-Tropfen.
- Während dieser Äquilibrationszeit in ES:**

- (1) 50 µLTropfen der VS-Lösung wie in Abb. 7 gezeigt vorbereiten und den CryoTip oder HSV Straw zum Laden vorbereiten.

Folgen Sie dem Protokoll, wie oben angewiesen (Teil A – Verglasungsprotokoll für Oozyten [MI]), von Schritten 8 durch 16 für Kontakt mit VS-Lösungen, Ladung der CryoTip, Untertauchung in LN₂, und langfristiges Lager.

Fuer weitere Einzelheiten zum Gebrauch diesen Produkten soll das Labor in seinen eigenen Protokollen nachschlagen, die für die spezifische medizinische Einstellung spezifisch entwickelt und optimiert worden sind.

AUFBEWAHRUNGSANWEISUNGEN UND STABILITÄT:

Die ungeöffneten Ampullen im Kühlschrank bei 2°C bis 8°C aufbewahren. Bei Aufbewahrung unter diesen Bedingungen sind die Vitrication Freeze Kit -Lösungen bis zum Haltbarkeitsdatum, das auf den Ampullen-Etiketten angegeben ist, haltbar.

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

Weil das Produkt menschliches Ursprungsmaterial enthält, können während der Aufbewahrung Schwebstoffe entstehen. Diese Art Schwebstoffe haben vermutlich keine Auswirkung auf die Produkt-Performance.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Diese Vorrichtung ist für die Anwendung durch Personal vorgesehen, das in Verfahren ausgebildet wurde, welche die für diese Vorrichtung angegebene zugelassene Anwendung beinhalten.

Wenn das Paket geöffnet ist, empfehlen wir, daß jedes CryoTip sorgfältig überprüft wird. CryoTips sollte mit einem Mikroskop (lineare Wiedergabe 40x) für mögliche Beschädigung überprüft werden.

Gebrauchen Sie kein Lösung-Fläschchen, das Zeichen von Schwebstoff oder Trübheit zeigt.

Behandeln Sie das Produkt mit aseptischen Methoden, um Kontaminierungsprobleme zu meiden.

Vitrification Freeze Kit Lösungen beinhalten das Antibiotikum Gentamicinsulfat. Passende Vorsichtsmassnahmen sollen getroffen werden, um zu sichern, dass Patienten keine Reaktion gegen dieses Antibiotikum haben werden.

Zurzeit zeigt Forschungsliteratur, dass die langfristigen Auswirkungen von Verglasung auf Embryos unbekannt bleibt.

***Die zur Herstellung dieses Produkts verwendeten menschlichen Blutderivate wurden mit FDA-lizenzierten Kits getestet und waren in Bezug auf das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen Hepatitis C (HCV) und Antikörper gegen das Human Immunodeficiency Virus (HIV) nicht reaktiv. Keine Testmethode liefert jedoch eine hundertprozentige Garantie, dass aus menschlicher Quelle gewonnene Produkte nicht infektiös sind. Alle menschlichen Blutderivate sollten mit unversellen Vorsichtsmaßnahmen so gehandhabt werden, als könnten sie eine Infektion übertragen. Die Spender dieser Quellenmaterialien wurden auch hinsichtlich des Risikos für Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) gescreent.**

Keine Flaschen verwenden, deren sterile Verpackung beschädigt wurde.

ORSICHT: Nach US-Bundesgesetz darf dieses Gerät nur von oder auf Antrag von einem Arzt verkauft werden.

USO PROGETTATO

Vit Kit® - Freeze deve essere utilizzato per l'uso nelle tecniche di riproduzione per la vitrificazione e la conservazione di oocite umane (MI) ed embrioni (zigoti a blastociste). Questo kit è stato progettato per essere utilizzato con il CryoTip® Irvine Scientific (N° di catalogo 40709) o con la palettette HSV (N° di catalogo 019921) e il Kit di scongelamento dei campioni vetrificati (Vit Kit® - Scongellamento) per un recupero ottimale dei campioni.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Soluzione di Equilibrizzazione-ES è una soluzione di tampone di HEPES di Medio-199 che contiene solfato di gentamicina (35 µg/mL), 7,5% (v/v) di ogni DMSO e glicolo di etilene e 20% (v/v) di Siero di Dextran di Sostituto*.

Soluzione di Vetrificazione- VS è una soluzione di tampone di HEPES di Medio-199 che contiene solfato di gentamicina (35 µg/mL) e 15% (v/v) di ogni DMSO e glicolo etilene, 20% (v/v) di Siero di Dextran di Sostituto* e 0,5 di succroso.

Questi due soluzioni devono essere utilizzati in sequenza in accordo con il protocollo di micro-goccia per disgelare passo a passo(step-wise microdrop vitrification protocol).

ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ DEL PRODOTTO

Le soluzioni in **Kit di Congelazione di Vit** sono filtrati sul membrane e controllati assetticamente in accordo con le tecniche di fabbricazione che erano stati convalidate per assicurare un livello di sterilità(SAL) di 10⁻⁷.

Ogni lotto di **Kit di Congelazione di Vit** riceve i seguenti controlli:

- Soluzioni e CryoTips:
 - Endotossine via metodologia di LAL
 - Biocompatibilità via assay di embrione di topo(una cellula)
 - Sterilizzazione via il Test di Sterilità attuale di USP<71>

Tutti i risultati sono archiviati su una lotto-specifico Certificato di Analisi, che è disponibile sulla richiesta.

MATERIE RICHIESTI MA NON INCLUSI

- CryoTip® Irvine Scientific (N° di catalogo 40709) o palettette HSV (N° di catalogo 0019921)
- Connettore Irvine Scientific (N° di catalogo 40736) o altro adattatore
- Capsule di Petri Sterilizzate (50 X 9mm, Falcon 351006 o equivalente)
- Criotubi (4.5 mL) o goblets e criocani
- Terreni di cultura HTF - HEPES modificati (N° di catalogo 90126) integrati con proteine
- Guanti usa e getta
- Siringa GASTIGHT® Hamilton (50 µL, N° di catalogo 80901) o un altro strumento di aspirazione
- Pipetti di trasferimento(pipette di vetro tirati o i punti con una diametro del punto inferiore di ~200µm)
- Pinzette
- Sigillante di impulso di calore
- Sigillatore SYMS per palettette HSV (N° di catalogo 016296)
- Arresto vigilato o timer
- Cisterna di Nitrogeno in Liquido (contenitore di Dewar o Styrofoam con tappo, volume di 1-2 L)
- Nitrogeno di Liquido(volume sufficiente per arrivare a una profondità di 4 polce nella cisterna)

ISTRUZIONI PER L'USO

Componenti di **Kit di Congelazione di Vit** (per applicazione):

- Equilibration Solution (ES): 60 µL per **Oocyte Vitrification Protocol O** 50 µL per il **protocollo del Vitrificazione del Embrione**
- Soluzione di Vitrificazione(VS): 50 µL per il **Protocollo di Vitrificazione**
- 1 CryoTip o con la palettette HSV **(per la conservazione di fino a 2 campioni)**
- 1 Connettore

PROTOCOLLO PER LA VITRIFICAZIONE

(per oocite ed embrioni):

Notabene: Le procedure/tecniche devono essere fatti a temperatura ambientale (20-27° C). Non utilizzare microscopie scaldati per le tecniche seguenti. **Caution:** Minimizzare esposizione alla luce durante l'equilibrizzazione

nelle soluzioni di es e vs.

- Portare la quantità di soluzione di equilibrio ES e soluzione di vetrificazione VS da utilizzare a temperatura ambiente (20-27 °C). NOTA: quando è necessario utilizzare una sola parte della soluzione, evitare di portare ripetutamente le intere fiale di ES e VS a temperatura ambiente. È consigliabile aliquotare la quantità da utilizzare e riportare le fiale a 2-8 °C subito dopo averle aliquotate. HTF modificato (HEPES) con proteina e richiesto per il protocollo della vetrificazione delle oocite.
- Riempiere il cisterno di nitrogeno liquido con nitrogeno liquido (sufficiente per arrivare a una profondità di 4 polce o per sottomettere completamente il criotubo o cane) e mettere vicino al microscopio. Attaccare un criotubo o goblet(nontappato) al morsetto al fondo del criocane e sottomettere nel nitrogeno liquido in preparazione per la conservazione delle campione vetrificate.
- Determinare il numero di campioni per essere vetrificati.
- Apporre un'etichetta con le informazioni necessarie su ogni piatto sterile Petri (o copercchio) e sul dispositivo di conservazione Cryo.
- Capovolgere gentilmente ogni fiala di ES e VS due volte per mescolare i contenenti prima dell'uso.
- Preparare la capsula con goccioline delle soluzione per il Procedimento di Vetrificazione così:

A. PROTOCOLLO DI OOCITE (MI):

NOTABENE: Refieri al *Parte B* per il protocollo del vetrificazione dell'embrione.

- Distribuire in maniera asettica alcune cadere da 20 µL di terreno di cultura, HTF-HEPES modificato con proteine e l'ES vicino al copercchio rovesciato di una piastra di petri sterile, come mostrato nella **Figura 1**, e posizionare la piastra sul piano del microscopio:
 - una goccia da 20 µL di HTF modificato (HEPES con proteine)
 - Tre gocce di 20 µL (60µL in totale) di ES (ES1, ES2, ES3)
- Rimuovere la capsula di cultura che contiene i oocite di MI dall'incubatrice e controllare la qualità delle campione sul microscopio. **Dove possibile, selezionare solo le oocite di qualità migliori di MI.**
- Avvertimento: Minimizzare l'esposizione delle campione al luce durante l'equilibrizzazione nelle gocce di H, ES e VS.**
- Trasferire il oocite(fino a 2 alle volta) con un volume minimo della sostanza della capsula di cultura (nella incubatrice) nella goccia di **H** per 1 minuto.
- Combinare la goccia di H al ES1 (vedi Figure 1, freccia 1) con il punto della pipetta di trasferimento e permettere il mescolare spontaneo delle 2 soluzione per **2 minuti**.
- Mescolare poi la goccia di ES2 (freccia 2) alle gocce mescolate in precedenza e lasciare riposare per **2 minuti**.
- Trasferire l'ovocita (o ovociti) con un volume minimo di soluzione dalla goccia mescolata alla goccia ES3 per **6-10 minuti**. **NOTABENE:** l'equilibrizzazione delle oocite in ES3 è completato quando la larghezza delle spazi delle zone pellucida e perivitelline sono uguali. Il oocite si stabilisce al fondo della goccia entro **3 minuti**.

- Durante il periodo d'equilibrizzazione in ES3: Distribuire in modo asettico una (1) goccia di 50 µL di VS 2 minuti prima di completare l'equilibrimento e preparare la cannucchia Cryotip (fig. 3) o HSV (fig. 4) per il caricamento:**

- CryoTip:** per ottenere una tenuta ottimale, connetterlo alla siringa Hamilton o ad uno strumento di aspirazione adeguato utilizzando un connettore o un adattatore. NOTA: tenere la copertura metallica sulla punta fine estratta leggermente per proteggerla fino a quando non si è pronti a caricare i campioni.
- Palettette HSV:** connettere l'estremità più lunga del dispositivo di inserimento in plastica blu all'estremità colorata dell'asta per la manipolazione.

- I passi seguenti (9 a 13) devono essere finiti entro 90-110 secondi.** **AVVERTIMENTO:** L'esposizione delle campioni al VS deve essere limitato per prevenire citotossicità. I campioni tendono di ondeggiare in VS, allora aggiustare il foco attraverso il microscopio per mantenere visualizzazione continuo durante l'esposizione e mantenere il punto della pipetta di trasferimento vicino per

assicurare il trasferimento veloce tra le gocce di VS. Refieri a Figure 5.

- Dopo l'equilibrizzazione in ES e finita, portare una quantità di ES nella pipetta di trasferimento e trasferire il campione(i) con un volume minimo dalla goccia di ES nel della **prima goccia di VS per 30 secondi**.
- Utilizzando la seguente procedura, caricare e sigillare CryoTip mediante calore (vedi Figura 6a):**
 - Infilare la bussola di metallo copercchio su vicino al CryoTip per esporre il punto dell'angolo fino fragile.
 - Aspirare attentamente mentre maneggiando il CryoTip e siringa quando lo osservi sul microscopio un volume piccolo di VS all' **Marchio #1** sulla CryoTip.
 - Continuare l'osservazione sul microscopio ed aspirare il campione gentilmente con VS al **Marchio #2** sulla CryoTip.
 - Osservare adesso il CryoTip direttamente ed aspirare di più VS al **Marchio #3**.
 - Campane deve essere messo fra il **Marchio #2 e Marchio #3**.
 - Sigillare con calore (**Sigillo #1**) il CryoTip su(o appena giu) dal **Marchio #1**, e disfilare la bussola di metallo di copercchio giu per coprire e proteggere il punto fino e fragile.
 - Rimuovere attentamente CryoTip dallo strumento di aspirazione e dall'adattatore e sigillarlo con il calore (**Sigillo n°2**) all'estremità inspessita di CryoTip al di sopra del **Segno n°4**.
 - Sottomettere il CryoTip coperto direttamente nella nitrogeno liquido(congelando al ritmo di ~12,000°/min) (vedi Figure 6b).

Caricare e sigillare la palettette HSV utilizzando la seguente procedura:

- Utilizzando una micropipetta, depositare attentamente il/i campione/i nella scanalatura dell'asta capillare fino ad 1 mm dall'estremità. La goccia contenente il/i campione/i deve avere un volume inferiore a 0,5 µL. È possibile inserire un massimo di 2 oociti o embrioni in ciascuna asta capillare.
- Posizionare immediatamente l'asta capillare e il manipolatore nella palettette e premere fino a quando la porzione rettangolare del manipolatore non entra in contatto con l'estremità svassata della palettette.
- Comprimere delicatamente la palettette tra pollice e indice e rimuovere il dispositivo di inserimento.
- Mentre si tiene la palettette, sigillare l'estremità aperta utilizzando un sigillatore SYMS.
- Tenere la palettette nella zona dell'asta per la manipolazione utilizzando delle pinze.
- Immergere rapidamente l'intera palettette nell'azoto liquido (LN₂) mantenendola in posizione verticale. Agitare delicatamente la palettette nell'azoto liquido (LN₂) per qualche secondo in modo da evitare la formazione di uno strato d'aria isolante attorno alla palettette.
- Posizionare la CryoTip o la palettette HSV vetrificate nel criotubo o nella coppa (nel supporto cryocane) riempiti con azoto liquido (LN₂). Al fine di proteggere la CryoTip o la palettette HSV vetrificate presenti nell'azoto liquido, tappare il criotubo (o la coppa) o unirli, capovolgendoli, ad un altro criotubo non tappato.
- Muovere la cisterna di LN₂ vicino al crio-congelatore di LN₂ e trasferire il criocane con i contenenti al criocongelatore per conservazione a lungo termine.

B. PROTOCOLLO DI VITRIFICAZIONE D'EMBRIONI (PN A BLASTOCISTI)

- Dispensare asetticamente una goccia di 50 µL di ES sulla tappo invertito per conservazione a lungo termine.
- Rimuovere la capsula di cultura con l'embrioni dall'incubatrice e controllare la qualità delle campione sull' microscopio. **Dove possibile, selezionare solamente solo l'embrioni del migliore qualità per vetrificazione.**
- Trasferire attentamente i campioni (fino a due alla volta) con un volume minimo di sostanza dalla capsula di cultura al goccia di ES e incominci il timer o cronografo. L'embrioni devono equilibrarsi nella goccia di ES lentamente via (cadere liberamente) free-fall per 6 a 10 minuti.

NOTABENE: IL CAMPIONE DIMINUISCE E POI DOPO SE RITORNA GRADUALMENTE ALLA LARGHEZZA ORIGINALE, CHE INDICA CHE L'EQUILIBRAZIONE È FINITA.

AVVERTIMENTO: Minimizzare l'esposizione della campione alla luce durante l'equilibrizzazione nelle gocce di ES e VS.

- Durante questo periodo d'equilibrizzazione in ES:**

- erogare (1) 50 µL cadere di soluzione VS, come mostrato nella Figura 7, e preparare la CryoTip o la palettette HSV per il caricamento.**

Seguirei il protocollo come è scritto sopra (sezione a- protocollo di vitrificazione dei oocite [mi]) dai passi 8 fino a 16 per l'esposizione alle soluzione di vs, il carico di cryotip, sottomettendo nel LN₂ e la conservazione a lungo termine. Istruzioni della conservazione

Per ulteriori dettagli sull'uso di queste prodotti, il laboratorio dovrebbe consultare le sue protocolli/tecniche standard che sono stati specificamente fatti ed ottimizzati per la sua impianto.

ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE E STABILITÀ:

Conservare i flaconi chiusi refrigerati a temperatura tra 2 °C e 8 °C. Quando sono conservate nel modo indicato, le soluzioni del kit di congelamento per vetrificazione sono stabili sino alla scadenza indicata sulle loro etichette.

Una volta aperti i contenitori, non utilizzare il mezzo per un periodo superiore a otto (8) settimane.

Nel prodotto è presente materiale di origine umana e si possono sviluppare sostanze particellari durante la conservazione. Per quanto noto, questo tipo di sostanze particellari non ha nessun effetto sulle prestazioni del prodotto.

PRECAUZIONI ED AVVERTIMENTI

Questo dispositivo è previsto per l'uso da parte di personale addestrato nelle procedure che comprendono le applicazioni indicate per le quali il dispositivo è previsto.

Quando il pacchetto è aperto, suggeriamo che ogni CryoTip è esaminato con attenzione. CryoTIPS dovrebbe essere esaminato con un microscopio (ingrandimento 40x) per danni possibili.

Non utilizzare qualsiasi fiale di soluzione che evidenzino torbidità o material di particelle.

Per evitare i problemi di contaminazione, maneggiare utilizzando tecniche in asepsi.

I Soluzioni di Congelazione di Vetrificazione contengono l'antibiotico solfato di gentamicina. Le precauzioni appropriate devono essere presi per assicurare che il paziente non è allergico a questo antibiotico.

Attualmente, la letteratura di ricerca indica che gli effetti di lungo termine di vitrificazione sull'embrioni rimangono sconosciuti.

"I derivati da sangue umano usati nella fabbricazione di questo prodotto sono stati testati tramite kit autorizzati dalla FDA e hanno mostrato di essere non reattivi verso l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg), gli anticorpi per l'epatite C (HCV) e gli anticorpi per il virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Tuttavia, nessun metodo di analisi offre una garanzia completa che i prodotti derivati da fonti umane siano non infettivi. Manipolare tutti i derivati da sangue umano come se fossero in grado di trasmettere infezioni, adottando le precauzioni universali. I donatori del materiale d'origine sono stati sottoposti anche ad analisi per il rischio di esposizione alla malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD, Creutzfeldt-Jacob disease).

Non usare flaconi in cui la confezione sterile sia stata compromessa.

CAUTELA: La legge federale (U.S.) se limita questo meccanismo/prodotto a la vendita da o sull'ordine di un medico o dottore.

APLICACIÓN

El Vit Kit[®]-Freeze ha sido desarrollado para la vitrificación y conservación de oocitos humanos (MI) y embriones (de zigotos a blastocisto) en técnicas de reproducción asistida. Este kit está indicado para su uso con los productos CryoTip[®] (n.º de catálogo 40709) o pajuela HSV (n.º de catálogo 019921) y kit de vitrificación (Vit Kit[®] - Thaw) de Irvine Scientific para la recuperación óptima de muestras.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Solución Equilibrante-ES: es una solución de Medio-199 tamponada con HEPES que contiene sulfato de gentamicina (35 mg/mL), 7,5% (v/v) de DMSO y de etilenglicol, 20% (v/v) de Dextran Serum Supplement[®] y 0,5 M de sacarosa.

Solución de Vitrificación-VS: es una solución de Medio 199 tamponada con HEPES que contiene sulfato de gentamicina (35 mg/mL), 15% (v/v) de DMSO y de etilenglicol, 20% (v/v) de Dextran Serum Supplement[®] y 0,5 M de sacarosa.

Estas dos soluciones deben usarse secuencialmente siguiendo los pasos del protocolo de vitrificación en microgotas.

CONTROL DE CALIDAD

Las soluciones incluidas en el Vit Kit-Freeze están filtradas a través de membrana y procesadas en condiciones de esterilidad de acuerdo a los procesos de manufactura validados para conseguir un nivel de garantía de esterilidad (SAL) de 10⁻³.

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

- Endotoxinas por el método LAL
- Biocompatibilidad por ensayo en embriones de ratón (1 célula)
- Esterilidad de acuerdo al ensayo de esterilidad USP vigente <71>

Todos los resultados se reflejan en el Certificado de Análisis específico de lote disponible, el cual se suministra bajo solicitud.

MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO EN EL KIT

- CryoTip[®] (n.º de catálogo 40709) o pajuela HSV (n.º de catálogo 019921) de Irvine Scientific
- Conector de Irvine Scientific (n.º de catálogo 40736) u otro adaptador
- Placas de Petri estériles (50 x 9 mm, Falcon 351006 o equivalentes)
- Criobultos (4,5 mL) o "goblets" y cestas de congelación
- Medio de cultivo HTF modificado - HEPES (n.º de catálogo 90126) suplementado con proteína
- Guanetes desechables
- Jeringa Hamilton GASTIGHT[®] (50 µL, n.º de catálogo 80901) u otra herramienta de aspiración
- Pipetas de transferencia (pipetas de cristal estradas o puntas de micropipeta con un diámetro interior de aprox. 200 µm).
- Pinzas
- Selladora por impulsos de calor
- Sellador SYMS para la pajuela HSV (n.º de catálogo 016296)
- Cronómetro o reloj
- Contenedor de nitrógeno líquido (contenedor Dewar o Styrofoam con tapa, con capacidad para 1-2 L)
- Nitrógeno líquido (volumen suficiente para conseguir una profundidad en el contenedor de unos 10cm)

INSTRUCCIONES DE USO

Componentes del Vit Kit-Freeze necesarios para cada aplicación:

- Solución equilibrante (ES):
- 60 µL para el **Protocolo de Vitrificación de Oocitos**
- o
- 50 µL para el **Protocolo de Vitrificación de Embriones**
- Solución de Vitrificación (VS):
- 50 µL para el **Protocolo de Vitrificación**
- 1 CryoTip o pajuela HSV (**puede almacenar hasta 2 muestras**)
- 1 Conector

PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN

NOTA: el proceso debe llevarse a cabo a temperatura ambiente (20-27°C). NO utilice la

platina calefactora del microscopio para los pasos descritos a continuación. **PRECAUCIÓN:** Minimice la exposición de la muestra a la luz durante su equilibrado en las soluciones ES y VS.

- Deje la cantidad que vaya a usar de la solución de equilibrado (ES) y la solución de vitrificación (VS) a temperatura ambiente (20-27 °C). NOTA: Evite dejar los frascos enteros de ES y VS a temperatura ambiente repetidamente si solamente necesita una parte de la solución cada vez. Es mejor obtener la parte alcuota de la cantidad que necesite usar y refrigerar de nuevo los frascos a 2-8 °C inmediatamente después. Para oocitos, también es necesario preparar HTF modificado (HEPES) con proteína.
- Llene un contenedor con nitrógeno líquido (suficiente volumen para poder sumergir en él un criobuto en su cesta y sitúelo cerca del microscopio. Enganche un criobuto o "goblet" (destapado) a la abrazadera inferior de una cesta de congelación y sumérjalo en el N líquido como preparación para el almacenamiento de las muestras vitrificadas.
- Determine el número de muestras a vitrificar.
- Etiquete una placa de Petri estéril (o tapa) y dispositivo de crio conservación con la información necesaria.
- Antes de usar las soluciones ES y VS, mezcle su contenido con un par de inversiones suaves de los viales.
- Prepare las placas con las gotas de soluciones de la siguiente manera para el proceso de Vitrificación:

A. Protocolo de Vitrificación de OOCITOS (MI)

NOTA: Lea la sección B para el protocolo de vitrificación de embriones

- Dispense asépticamente gotas de 20 µL del medio de cultivo, HTF modificado - HEPES con proteína, y de ES en proximidad cercana sobre una placa de Petri invertida estéril tal como se muestra en la **Figura 1** y coloque la placa en la platina del microscopio:
 - una gota de 20 µL de HTF modificado (HEPES con proteína)
 - 3 gotas de 20µL (60µL en total) de ES (ES1, ES2, ES3)
 - Saque del incubador la placa de cultivo con los oocitos MI y compruebe al microscopio la calidad de las muestras. **Siempre que sea posible, seleccione sólo los oocitos (MI) de mejor calidad.**
- PRECAUCIÓN: Minimice la exposición de la muestra a la luz durante su equilibrado en las soluciones ES y VS.**
- Transfiera el oocito (hasta 2 a la vez) con el mínimo volumen posible del medio de la placa de cultivo (del incubador) a la gota **H** de 20µL.
 - Con la punta de la pipeta de transferencia, acerque hasta fusionar la gota H y la ES1 (ver Fig.1, flecha 1) y permita la mezcla espontánea de las 2 soluciones durante **2 minutos**.
 - A continuación, mezcle la gota de ES2 (flecha 2) con las gotas anteriormente mezcladas y deje reposar durante **2 minutos**.
 - Transfiera el(los) oocito(s) con el mínimo volumen posible de solución de la gota combinada a la gota ES3 por un periodo de **6 a 10 minutos**..

NOTA: el equilibrado de los oocitos en ES3 se habrá completado cuando el grueso de la zona pelúcida y el espacio perivitelino sean iguales. El oocito(s) se asentará al fondo de la gota en unos 3 minutos.

- Durante este tiempo de equilibrado en ES3: En condiciones de esterilidad dispense una (1) gota (de 50 µL) de solución VS dos (2) minutos antes de terminar el equilibrado y prepare la CryoTip (Fig.3) o pajuela HSV (Fig.4) para la carga:
 - CryoTip:** conectar a la jeringa Hamilton o a una herramienta apropiada de aspiración mediante un conector o adaptador para asegurar un cierre hermético. NOTA: Mantenga la cubierta de metal sobre la punta fina estirada para protegerla hasta que se vayan a cargar las muestras.
 - Pajuela HSV:** conectar el extremo más largo del dispositivo de inserción azul de plástico al extremo de color del manipulador.
- Los siguientes pasos (9-13) deben llevarse a cabo en 90-110 segundos. **PRECAUCIÓN: debe limitarse la exposición de las muestras a la VS para impedir el efecto citotóxico. Dado que las muestras tienden a flotar en la VS, ajuste el microscopio para**

mantener un control visual continuado durante la exposición, y mantenga la punta de la pipeta de transferencia cerca para asegurar una transferencia rápida entre las gotas de VS. Ver figura 5.

- Al completar el equilibrado en ES, aspire un poco de ES con la pipeta de transferencia y transfiera la muestra(s) con el mínimo volumen desde la gota de ES **gota de VS durante 30 segundos**.
 - Cargue y selle térmicamente el CryoTip como se indica a continuación (véase Figura 6a):**
 - Deslice la funda de metal hacia arriba a lo largo del CryoTip para exponer el frágil extremo de la punta.
 - Observando bajo el microscopio, manipule el CryoTip y la jeringuilla , aspire cuidadosamente un pequeño volumen de VS hasta la **Marca # 1** del CryoTip.
 - Continúe observando al microscopio y aspire suavemente la muestra con VS hasta la **Marca # 2** del CryoTip.
 - Observe el CryoTip directamente y aspire más VS hasta la **Marca # 3**.
 - La muestra debe situarse entre la **Marca #2** y la **Marca #3**.
 - Termoselle (**Sellado #1**) el CryoTip sobre (o justo debajo) de la **Marca # 1**, y deslice la funda metálica hacia abajo para tapar y proteger la frágil punta fina.
 - Extraiga con cuidado el CryoTip de la herramienta de aspiración y del adaptador y a continuación selle térmicamente (sello n.º 2) el extremo grueso del CryoTip sobre la marca n.º 4.
 - Sumergir el CryoTip recubierto con la funda directamente en el Nitrógeno líquido (enfriando a una velocidad de -12000°C/min) (ver Figura 6b).
 - Cargue y selle la pajuela HSV como se indica a continuación:**
 - Usando una micropipeta, deposite con cuidado la(s) muestra(s) en la boca del tubo capilar a 1 mm desde el extremo. La mezcla con la(s) muestra(s) debe ser inferior a 0,5 µL. Máximo de 2 ovocitos o embriones por tubo capilar.
 - Coloque inmediatamente el tubo capilar y el manipulador en la pajuela y empuje hasta que la parte rectangular del manipulador esté en contacto con el extremo ensanchado de la pajuela.
 - Pellicize ligeramente la pajuela con el pulgar y el índice y extraiga el dispositivo de inserción.
 - Mientras sujeta la pajuela, selle el extremo abierto usando un sellador SYMS.
 - Sujete la pajuela usando pinzas en la zona del manipulador.
 - Empuje rápidamente toda la pajuela en el LN₂ de forma vertical. Agite suavemente la pajuela en el LN₂ durante unos segundos para evitar la formación de una capa de burbujas de aire aislantes alrededor de la pajuela.
 - Coloque el CryoTip o la pajuela HSV vitrificados en el criobuto o frasco (en el vial criogénico) sumergido de LN₂. Tape el criobuto (o frasco) o colóquelo boca arriba sobre otro criobuto sin tapar para fijar el CryoTip o la pajuela HSV vitrificados en nitrógeno líquido.
 - Coloque el contenedor de Nitrógeno líquido cerca del crio-congelador de Nitrógeno líquido y transfiera la cesta de congelación con su contenido a dicho congelador para su almacenamiento a largo plazo.
- B. EMBRIONES (PN a Blastocisto): Protocolo de Vitrificación**
- En condiciones asépticas dispense 1 gota de 50µL de ES sobre una tapa invertida de una placa de Petri.
 - Saque del incubador la placa de cultivo con los embriones y compruebe bajo el microscopio la calidad de los mismos. **Siempre que sea posible, seleccione para la vitrificación sólo los embriones de mejor calidad.**
 - Aspire una pequeña cantidad de solución ES (de la gota de ES) en la pipeta de transferencia y con cuidado transfiera la muestra (hasta 2 a la vez) con el mínimo volumen de medio de la placa de cultivo a la gota de ES y ponga en marcha el cronómetro. Los embriones deben equilibrarse lentamente en la gota de ES cayendo libremente durante unos 6-10 minutos.

Nota: la muestra perderá volumen y a continuación lo recuperará lentamente volviendo a su forma original indicando que el equilibrio se ha completado. **PRECAUCIÓN:** Minimice la exposición de la muestra(s) a la luz durante la etapa de equilibrio en las gotas de ES y VS.

4. Durante esta etapa de equilibrio:

- vierta (1) 50 µL gotas de solución VS tal como se indica en la Figura 7 y prepare el CryoTip o la pajuela HSV para la carga.

Siga el protocolo descrito anteriormente (Sección A- Protocolo de Vitrificación de OOCITOS (MI)) desde el paso 8 hasta el paso 16 para la exposición a soluciones VS, carga del CryoTip, inmersión en el Nitrógeno Líquido y almacenamiento a largo plazo.

Para más detalles sobre la utilización de estos productos, consulte los protocolos de trabajo de su propio laboratorio, los cuales han sido desarrollados y especialmente optimizados de acuerdo a su programa médico particular.

IINSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN Y

ESTABILIDAD:

Conserve los envases no abiertos refrigerados a una temperatura de 2 ° a 8 °C. Si se conservan según lo indicado, las soluciones del kit de Congelación post Vitrificación son estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas de los envases.

No utilice el medio por más de ocho (8) semanas después que los envases hayan sido abiertos.

Ya que el producto contiene sustancia de origen humano puede desarrollar partículas durante el almacenaje. No hay evidencia que partículas de esta clase tengan un efecto sobre el funcionamiento del producto.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Este dispositivo debe ser utilizado por personal capacitado en procedimientos que incluyan la aplicación prevista para el mismo.

Como precaución adicional durante la preparación del proceso, recomendamos que cada CryoTip sea examinado cuidadosamente al sacarlo del envase. Antes de su uso, el CryoTip debería ser observado al microscopio bajo un aumento suficiente (40x) para comprobar que no haya sufrido daños (rotura de punta o grietas) durante el transporte.

No utilice ningún vial cuya solución muestre evidencias de material precipitado o turbio.

Para evitar problemas de contaminación, utilice técnicas asépticas de manipulación.

Las Soluciones del Kit de Congelación por Vitrificación contienen el antibiótico sulfato de gentamicina. Debe tomar las precauciones adecuadas para asegurar que la paciente no es sensible a dicho antibiótico.

En la actualidad, la bibliografía indica que los efectos a largo plazo de la vitrificación de embriones son aún desconocidos.

***Los hemoderivados humanos utilizados en la fabricación de este producto han sido probados mediante kits autorizados por la FDA y se ha determinado que no son reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), los anticuerpos frente a la hepatitis C (VHC) ni los anticuerpos frente al virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ningún método analítico ofrece garantías absolutas de que los productos derivados de fuentes humanas no sean infecciosos. Manipule todos los hemoderivados humanos como si fueran capaces de transmitir infecciones, utilizando precauciones universales. Los donantes del material fuente también se han sometido a pruebas de detección del riesgo de exposición a la enfermedad de Cruetzfeldt-Jakob (ECJ).**

No usar frascos en los que el envase estéril esté dañado.

PRECAUCIÓN: Las leyes federales (U.S.) restringen la venta de este producto a la prescripción de un facultativo.

UTILISATION

Vit Kit® – Freeze est prévu pour la vitrification et la conservation des ovocytes (M II) et des embryons (zygote au blastocyste) humains lors des procédés de procréation médicalement assistée. Ce kit est conçu pour être utilisé avec le CryoTip® (référence du catalogue 40709) ou l'ensemble jonc-capillaire du kit de vitrification haute sécurité (HSV) (référence du catalogue 019921) et le kit de décongélation de vitrification (Vit Kit® - décongélation) d'Irvine Scientific pour une récupération optimale des échantillons.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Solution d'équilibration – ES est une solution composée du milieu 199 tamponné avec du HEPES et contenant, du sulfate de gentamicine (35µg/ml), 7,5% (v/v) DMSO, 7,5% (v/v) éthylène glycol et 20% (v/v) Supplément Sérum de Dextran®.

Solution de vitrification – VS est une solution composée du milieu 199 tamponné avec du HEPES et contenant, du sulfate de gentamicine (35µg/ml), 15% (v/v) DMSO, 15% (v/v) éthylène glycol, 20% (v/v) Supplément Sérum de Dextran® et du sucrose 0,5M.

Ces deux solutions doivent être utilisées en série selon les étapes du protocole de vitrification en micro-gouttes.

ASSURANCE QUALITÉ

Les solutions contenues dans le Vit Kit – Freeze ont été stérilisées par filtration et traitées de manière aseptique selon des procédures de fabrication qui répondent au niveau 10⁻³ de stérilité (Sterility Assurance Level).

Chaque lot de Vit Kit – Freeze a subi les tests suivants :

- Solutions et CryoTips:
- Contenu en endotoxines par la méthode LAL.
 - Test de bio-compatibilité par le test d'embryons de souris (embryons à une cellule)
 - Stérilité par les tests courants de la pharmacopée américaine (USP 71)

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

MATÉRIEL REQUIS, NON INCLUS DANS LE KIT

- CryoTip® (référence du catalogue 40709) ou ensemble jonc-capillaire HSV (référence du catalogue 0019921) d'Irvine Scientific
- Connecteur d'Irvine Scientific (référence du catalogue 40736) ou autre adaptateur
- Boîtes de pétri stériles (50 x 9 mm, Falcon 351006 ou équivalent)
- Cryotubes (4,5 mL) ou gobelets et Cryocanes
- HTF - HEPES modifié (référence du catalogue 90126) milieu de culture supplémenté en protéines
- Gants à usage unique
- Seringue Hamilton GASTIGHT® (50 µl, référence du catalogue 80901) ou autre outil d'aspiration
- Pipettes de transfert (pipettes de verre étrées ou des bouts de micro-pipettes avec un diamètre interne d'environ 200 µm)
- Pince
- Thermosoudouse électrique à impulsions
- Soudouse SYMS pour l'ensemble jonc-capillaire HSV (référence du catalogue 016296)
- Chronomètre
- Réservoir d'azote liquide (Dewar ou boîte en polystyrène avec couvercle d'une capacité de 1 à 2 litres)
- Azote liquide (en quantité suffisante pour obtenir un fond de 10 cm environ)

CONSEILS D'UTILISATION

- Composantes du Vit Kit – Freeze requises (par application):
- Solution d'équilibration (ES) :
60 µl pour le **protocole de vitrification des ovocytes**
ou
50 µl pour le **protocole de vitrification des embryons**
 - Solution de vitrification (VS) :
50 µl pour le **protocole de vitrification**
 - Un CryoTip ou l'ensemble jonc-capillaire du kit de vitrification haute sécurité (HSV) **peut contenir 1 ou 2 spécimens**
 - Un connecteur

PROTOCOLE DE VITRIFICATION :

REMARQUE : Ces procédures doivent être effectuées à température ambiante (20-27°C). Ne pas utiliser la platine chauffante du microscope

durant ce procédé. ATTENTION : minimiser l'exposition des spécimens à la lumière durant l'équilibration dans les solutions ES et VS.

1. Amener un flacon de chacune des solutions ES et VS à température ambiante (20-27°C) plus du milieu modifié-HTF (HEPES) avec protéines, requis pour les ovocytes. Le milieu modifié-HTF (tamponné au HEPES) avec protéines est aussi requis pour le protocole de vitrification des ovocytes.
2. Remplir le réservoir d'azote liquide (en quantité suffisante pour obtenir 10 cm de profondeur ou complètement submerger le cryotube fixé sur une cryocane) et le placer à côté du microscope. Attacher le cryotube ou le gobelet (décapsulé) à la plus basse attache de la cryocane et submerger dans l'azote liquide; la cane est ainsi prête à accueillir les spécimens vitrifiés.
3. Déterminer le nombre de spécimens à vitrifier.
4. Marquer chaque boîte de pétri stérile (ou son couvercle) et chaque CryoTip avec l'information nécessaire.
5. Retourner doucement chacun des flacons ES et VS deux fois pour en mélanger le contenu avant utilisation.
6. Préparer une boîte de pétri avec des gouttelettes de solutions de vitrification de la manière suivante :

A. Protocole de vitrification des ovocytes (MII)

REMARQUE : Pour le protocole de vitrification des embryons, se référer à la **section B**.

1. Répartissez de manière aseptisée des laisser tomber 20 µl du milieu de culture, HTF-HEPES modifié avec des protéines, et la solution ES de façon rapprochée sur le couvercle inversé d'une boîte de pétri stérile, comme indiqué sur la Figure 1, et placez la boîte sur la platine du microscope:
 - une goutte de 20 µl de HTF modifié (HEPES avec protéines)
 - Trois gouttelettes de 20 µl (60 µl au total) de ES (ES1, ES2, ES3)
2. Sortir la boîte de culture contenant les ovocytes de l'incubateur et vérifier la qualité des spécimens sous un microscope. **Dans la mesure du possible, sélectionner uniquement les ovocytes MII de meilleure qualité.**
ATTENTION : Minimiser l'exposition des spécimens à la lumière durant l'équilibration dans les gouttelettes H, ES et VS.
3. Avec un volume minimal du milieu de culture, transférer les ovocytes (une ou deux à la fois) de la boîte de pétri (incubateur) dans la gouttelette de 20 µl de mod. HTF-HEPES pendant 1 minute.
4. Faire couler les gouttelettes H et ES1 (cf. figure 1, flèche 1) avec le bout de la pipette de transfert et laisser le mélange des deux solutions se faire de manière spontanée pendant **2 minutes**.
5. Ajoutez ensuite la goutte d'ES2 (flèche 2) aux gouttes précédemment ajoutées et laissez reposer pendant **2 minutes**.
6. Transférer les ovocytes avec un volume minimum de solution de la goutte confluée dans la goutte ES3 pendant **6 à 10 minutes**. **Remarque: l'équilibration des ovocytes dans ES3 est complète quand l'épaisseur de la zone pellucide et celle de l'espace périvitellin sont égales. Les ovocytes se déposeront au fond de la gouttelette dans les 3 minutes.**

7. **Durant cette équilibration dans ES3 : Distribuer de façon aseptique une (1) goutte de 50 µl de VS 2 minutes avant pour compléter l'équilibration et préparer le CryoTip (fig. 3) ou la paillette VHS (fig. 4) pour le chargement:**
 - **CryoTip:** Se connecte à la seringue Hamilton ou à un outil d'aspiration approprié à l'aide d'un connecteur ou d'un adaptateur pour garantir une fermeture hermétique. REMARQUE : gardez le manchon métallique sur la pointe fine tirée afin de la protéger jusqu'à ce que vous soyez prêt à charger les échantillons.
 - **Ensemble jonc-capillaire HSV:** connecte l'extrémité longue du dispositif d'insertion en plastique bleu à l'extrémité colorée du capillaire de manipulation.
8. **Les étapes suivantes (9-13) doivent être complétées dans 90-110 secondes.**
ATTENTION : L'exposition des spécimens au VS doit être limitée pour prévenir toute cytotoxicité. Les spécimens ont tendance à flotter dans la solution de vitrification (VS), ajuster la mise au point du microscope pour maintenir une visualisation continue durant l'exposition et garder le bout de la pipette de

transfert proche pour assurer un transfert rapide entre les différents gouttelettes VS. Se référer à la figure 5.

9. A la fin de l'équilibration dans ES, aspirer un peu de ES dans la pipette de transfert et transférer les spécimens avec un minimum de volume de la gouttelette ES au **gouttelette VS pendant 30 secondes**.
 10. **Chargez et soudez à la chaleur le CryoTip comme indiqué ci-après (Voir Figure 6a):**
 - Glisser la manche métallique le long du CryoTip pour exposer le bout fin et fragile.
 - En manipulant le CryoTip et la Hamilton GASTIGHT® Seringue sous le microscope, soigneusement aspirer un petit volume de VS jusqu'au **repère n°1** du CryoTip.
 - Continuer l'observation sous le microscope et aspirer doucement les spécimens avec la solution VS jusqu'au **repère n°2** du CryoTip.
 - Maintenant, en regardant le CryoTip directement, aspirer plus de solution VS jusqu'au **repère n°3**.
 - Sceller le CryoTip à la chaleur au niveau du repère n°1 (**souder n°1**). Glisser la manche couvrante vers le bas pour couvrir et protéger le bout fin et fragile.
 - Retirez précautionneusement le CryoTip de l'outil d'aspiration et de l'adaptateur puis soudez à la chaleur (**Souder N° 2**) au niveau de l'extrémité épaisse du CryoTip au-dessus de la **marque N° 4**.
 - Plonger le CryoTip couvert directement dans l'azote liquide (taux de refroidissement de -12.000°C/min) (cf. figure 6b).
- Chargez et soudez l'ensemble jonc-capillaire HSV comme indiqué ci-après:**
- À l'aide d'une micropipette, déposez avec précautions le ou les échantillons dans la gouttière du capillaire à 1 mm de l'extrémité. La goutte contenant le ou les échantillons doit être inférieure à 0,5 µl. Deux ovocytes ou embryons au maximum pour chaque capillaire.
 - Placez immédiatement le capillaire et le manipulateur dans le jonc et poussez jusqu'à ce que la partie rectangulaire du manipulateur entre en contact avec l'extrémité élargie du jonc.
 - Pincez légèrement le jonc entre votre pouce et votre index et retirez le dispositif d'insertion.
 - Tout en maintenant le jonc en place, soudez l'ouverture à l'aide de la soudeuse SYMS.
 - Tenez le jonc avec des pinces dans la zone du capillaire de manipulation.
 - Plongez rapidement la totalité du jonc dans l'azote liquide (LN₂) en position verticale. Remuez délicatement le jonc dans l'azote liquide (LN₂) pendant quelques secondes afin d'éviter la formation d'une couche de bulles d'air isolantes autour du jonc.
11. Placez le CryoTip ou l'ensemble jonc-capillaire HSV vitrifié dans le tube cryogénique ou gobelet rempli submergé dans l'azote liquide (LN₂) (sur le cryocane). Bouchez le tube cryogénique (ou gobelet) ou fixez-le la tête à l'envers à un autre tube cryogénique non bouché afin de sécuriser le CryoTip ou l'ensemble jonc-capillaire HSV vitrifié dans l'azote liquide.
 12. Déplacer le réservoir d'azote liquide à proximité de la banque à azote liquide, transférer les cryocanes avec leur contenu dans la banque pour le stockage à long terme.

B. Protocole de vitrification des embryons (PN au blastocyste)

1. Déposer stérilement une gouttelette ES de 50 µl sur un couvercle renversé de boîte de pétri.
2. Sortir la boîte de culture avec les embryons de l'incubateur et vérifier la qualité des spécimens sous le microscope. **Dans la mesure du possible, sélectionner uniquement les embryons de meilleure qualité pour la vitrification.**
3. Aspirer un peu de solution ES (de la gouttelette) dans la pipette de transfert et soigneusement transférer les spécimens (jusqu'à deux à la fois et avec un volume minimal du milieu de culture) de la boîte de culture à la gouttelette ES les placer puis déclencher le chronomètre. Les embryons doivent doucement s'équilibrer dans la gouttelette ES par chute libre pendant 6 à 10 minutes.
Remarque : Le spécimen va rétrécir et graduellement retourner à sa taille d'origine, ceci indique que l'équilibration est complète.
ATTENTION : Minimiser l'exposition des spécimens à la lumière durant l'équilibration dans les gouttelettes ES et VS.
4. **Durant ce temps d'équilibration dans ES :**
 - Préparer (1) 50 µL gouttes de solution VS comme indiqué sur la Figure 7 et préparez

le CryoTip ou l'ensemble jonc-capillaire HSV pour le chargement.

Suivre le protocole comme indiqué ci-dessus (section A, protocole de vitrification des ovocytes [MI]), de l'étape 8 à l'étape 16 pour l'exposition à la solution VS, la mise en place dans les CryoTips, l'immersion dans l'azote liquide et le stockage à long terme.

Pour plus de détails sur l'utilisation de ce produit, chaque laboratoire doit consulter ses propres procédures et protocoles standards spécialement développés et optimisés pour chaque établissement médical particulier.

CONSIGNES DE CONSERVATION ET

STABILITÉ:

Conserver les flacons non entamés et fermés dans un réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C. Conservées ainsi, les solutions du Kit de Vitrification sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les étiquettes des flacons.

Ne pas utiliser les milieux au-delà de huit (8) semaines après l'ouverture des flacons.

Comme du matériel biologique d'origine humaine est présent dans le produit, l'apparition de matière particulière est possible durant sa conservation. Ce type de matière particulière ne semble avoir aucun effet sur la performance du produit.

PRÉCAUTIONS ET MISE EN GARDE

Ce dispositif est destiné à une utilisation par un personnel formé aux procédures comprenant l'application indiquée pour laquelle le dispositif est destiné.

Pour plus de précautions durant les préparatifs pour le procédé, il est recommandé d'examiner minutieusement les CryoTips à leur sortie de la boîte. Les CryoTips doivent être examinés sous microscope avec un grossissement convenable (x40) pour tout éventuel dommage (comme les cassures du bout ou fêlures) survenant durant le transport.

N'utiliser aucun flacon de solution trouble ou contenant des particules.

Manipuler stérilement afin d'éviter les problèmes de contamination.

Les solutions de ce kit contiennent l'antibiotique Sulfate de Gentamicine. Les précautions d'usage doivent être prises pour s'assurer que les patients ne présentent aucune sensibilité à cet antibiotique.

Actuellement, la littérature scientifique indique que l'effet à long terme de la vitrification sur les embryons reste encore inconnu.

***Les dérivés du sang humain utilisés pour fabriquer ce produit ont été testés au moyen de trousse brevétées de l'administration américaine pour l'alimentation et les médicaments (FDA) et reconnus non réactifs à l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs), aux anticorps de l'hépatite C (VHC) et aux anticorps du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Toutefois, aucune méthode d'examen ne garantit totalement la non contagiosité des produits dérivés de sources humaines. Manipulez tous les dérivés du sang humain comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection, c'est-à-dire en prenant toutes les précautions qui s'imposent. Les donneurs de matériaux source ont également été dépistés pour déceler d'éventuels risques d'exposition à la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ).**

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

ATTENTION : La loi fédérale limite la vente de ce dispositif aux médecins ou sur ordre d'un médecin.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Vit Kit® - Freeze destina-se à utilização em procedimentos de reprodução assistida para vitrificação e conservação de ócitos humanos (MI) e embriões (zigoto a blastocisto). Este kit foi concebido para ser utilizado em conjunto com CryoTip® (N.º de catálogo 40709) ou Palhinha HSV (N.º de catálogo 019921) e Kit de Descongelação com Vitrificação (Vit Kit® - Thaw) da Irvine Scientific para uma recolha óptima de amostras.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Equilibration Solution(Solução Equilibrante)-ES é uma solução tamponada com HEPES de Meio-199 e com sulfato de gentamicina (35 µg/mL), 7.5% (v/v) de DMSO e etilenoglicol cada e 20% (v/v) de Dextran Serum Supplement* (suplemento substituto do soro).

Vitrification Solution(Solução de Vitrificação)-VS é uma solução tamponada com HEPES de Meio-199 e com sulfato de gentamicina (35 µg/mL), 15% (v/v) de DMSO e etilenoglicol cada, 20% (v/v) de Dextran Serum Supplement* (suplemento substituto do soro) e 0.5 M de sucrose.

Estas 2 soluções devem ser utilizadas sequencialmente de acordo com o protocolo de vitrificação por microgotas "passo-a-passo".

Garantia de qualidade

As soluções do Vit Kit-Freeze são filtradas através de membrana e processadas assepticamente, de acordo com os procedimentos de fabrico que foram validados para atingir um nível de segurança de esterilidade (SAL) de 10⁻³.

Cada lote de Vit Kit- Freeze passa pelos seguintes testes:

Soluções e CryoTipes:

- Endotoxina pela Metodologia LAL
- Biocompatibilidade pelo ensaio do embrião de rato (unicelular)
- Esterilidade pelo actual USP Sterility Test <71>

Todos os resultados são notificados num Certificado de Análise específico de lote, que está disponível por pedido.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO INCLUIDOS

- Irvine Scientific CryoTip® (N.º de catálogo 40709) ou Palhinha HSV (N.º de catálogo 0019921)
- Conector Irvine Scientific (N.º de catálogo 40736) ou outro adaptador
- Placas de Petri Estéreis (50 X 9 mm, Falcon 351006 ou equivalente)
- Criotubos (4.5 mL) ou goblets e criocâmulas
- HTF – HEPES Modificado (N.º de catálogo 90126) meio de cultura suplementado com proteínas
- Luvas descartáveis
- Seringa Hamilton GASTIGHT® (50 µl, N.º de catálogo 80901) ou outro instrumento de aspiração
- Pipetas de transferência (pipetas de vidro ou pontas de micropipetas com um diâmetro interno da ponta de ~200 µm)
- Pinças
- Selante térmico (Impulse Heat Sealer)
- Vedante SYMS para Palhinha HSV (N.º de catálogo 016296)
- Cronómetro ou temporizador
- Reservatório de azoto líquido (contentor Dewar ou Styrofoam com tampa, volume 1-2 L)
- Azoto líquido (volume suficiente para atingir 10,16 cm de profundidade no reservatório)

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

- Equilibration Solution (ES): 60 µL para o **Protocolo de Vitrificaçãodos Ócitos** ou 50 µL para o **Protocolo de Vitrificação do Embrião**
- Vitrification Solution (VS): 50 µL de para **Protocolo de Vitrificação**
- 1 CryoTip ou Palhinha HSV (**armazena até 2 espécimes**)
- 1 Conector

PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO :

NOTA: Os procedimentos devem efectuar-se à temperatura ambiente (20-27° C). **NÃO** utilize a fase de microscópio aquecido para os procedimentos seguintes. **CUIDADO:** minimize a exposição do espécime à luz durante a fase de equilíbrio com as soluções ES e VS.

1. Deixe a quantidade a ser utilizada de Solução de

Equilíbrio (ES) e Solução de Vitrificação (VS) ficar à temperatura ambiente (20-27° C) **NOTA:** evite deixar frascos inteiros de ES e VS ficarem à temperatura ambiente repetidamente, quando apenas for necessária parte da solução de cada vez. É melhor retirar uma alíquota da quantidade a ser utilizada e voltar a colocar os frascos à temperatura de 2-8°C imediatamente após retirar a alíquota. O HTF (HEPES) modificado com proteína também é necessário para o protocolo de vitrificação dos ócitos.

- Encha o reservatório de azoto líquido (suficiente para atingir uma profundidade de 10,16 cm ou até submergir completamente o criotubo na cânula) e coloque perto do microscópio. Ligue um criotubo ou goblet (sem tampa) ao *clamp inferior* da criocânula e submerge-o no azoto líquido, como preparação para a conservação dos espécimes vitrificados.
- Determine o número de amostras que devem ser vitrificadas.
- Identifique cada placa de Petri estéril (ou a tampa) e armazene o dispositivo Cryo com as informações necessárias.
- Inverta cuidadosamente cada frasco de ES e VS duas vezes, para misturar o conteúdo antes de utilizar.
- Prepare a placa com gotas das soluções para Vitrificação Proceda do seguinte modo:

A. Protocolo de vitrificação de OÓCITOS (MI):

NOTA: Consulte a *Secção B* para o protocolo de vitrificação do embrião.

- Assepticamente, dispense cair de 20 µl de meio de cultura, HTF – HEPES Modificado com proteína, e ES em estreita proximidade numa tampa invertida de uma placa de Petri, conforme ilustrado na **Figura 1**, e coloque a placa no campo do microscópio:
 - uma gota de 20 µl de HTF Modificado (HEPES com proteína)
 - três gotas de 20µL (total de 60 µL) de ES (ES1, ES2, ES3)
- Remova a placa de cultura com os ócitos MI da incubadora e verifique a qualidade dos espécimes ao microscópio. **Quando for possível, selecione apenas os ócitos no estágio MI, de melhor qualidade. CUIDADO: minimize a exposição do espécime à luz durante a fase de equilíbrio nas gotas H, ES e VS.**
- Transfira o ócito (até 2 ao mesmo tempo) com um volume mínimo de meio da placa de cultura (na incubadora) para o interior da gota de 20µL de **H** durante 1 minuto.
- Funda a gota de H com o ES1 (ver Fig. 1, seta 1) com a ponta da pipeta de transferência e deixe que a mistura das 2 soluções se dê espontaneamente durante **2 minutos**.
- Em seguida, funda a gota de ES2 (seta 2) com as gotas anteriormente fundidas e deixe repousar durante **2 minutos**.
- Transfira o(s) ócito(s) da gota resultante da fusão, com um volume mínimo, para a gota ES3 **por 6 a 10 minutos. Nota: o equilíbrio do(s) ócito(s) em ES3 estará completo quando a espessura dos espaços da zona pelúcida e espaço perivitelino são iguais. O(s) ócito(s) vão assentar no fundo da gota no espaço de 3 minutos**.
- Durante o tempo de equilíbrio em ES3: Disponha assepticamente uma (1) gota de 50 µL de VS 2 minutos antes de completar a calibração e prepare a cryotip (fig. 3) ou palhinha HSV (Vitrificação de alta segurança) (fig. 4) para carregamento:**
 - CryoTip:** unir a seringa Hamilton ou um instrumento de aspiração apropriado utilizando um conector ou adaptador para garantir uma vedação estanque. **NOTA:** conserve a manga metálica de cobertura sobre a ponta fina exposta para a proteger até que esteja pronto para carregar as amostras.
 - Palhinha HSV:** unir a extremidade mais longa do dispositivo de plástico azul à extremidade colorida da vareta de manuseamento.
- Os passos seguintes (9-13) devem ser completados em 90-110 segundos. CUIDADO: a exposição das amostras ao VS deve ser limitada para evitar citotoxicidade. Os espécimes tendem a flutuar no VS, por isso, ajuste o foco através do microscópio para manter uma visualização contínua durante a exposição e mantenha a ponta da pipeta de transferência perto, para**

assegurar a transferência rápida entre gotas de VS.Consulte a Figura 5.

- Após a fase de equilíbrio em ES estar completa, coloque alguma quantidade de ES na pipeta de transferência e transfira o(s) espécime(s) com um volume mínimo da gota de **ES gota de VS durante 30 segundos**.
- Transfira rapidamente os espécimes da primeira gota de VS para o **CENTRO da segunda gota de VS (VS2) durante 5 segundos**.
- Depois transfira o(s) espécime(s) para o **CENTRO da terceira gota de VS (VS3) durante 10 segundos**.
- Finalmente, transfira o espécime para o **FUNDO da quarta gota de VS (VS4)**.
- Carregar e vedar termicamente o CryoTip da seguinte forma (ver a Figura 6a):**
 - Faça deslizar a manga de cobertura metálica ao longo da CryoTip para expor a extremidade frágil da ponta.
 - Seguando a CryoTip e a seringa enquanto observa ao microscópio, aspire cuidadosamente um pequeno volume de VS até à **Marca 1** da CryoTip.
 - Continue a observar ao microscópio e aspire cuidadosamente o espécime com o VS até à **Marca 2** da CryoTip.
 - Agora observe directamente a CryoTip e Pipetman mais VS até à **Marca 3**.
 - O espécime tem de estar colocado entre a **Marca 2 e a Marca 3**.
 - Sele a quente (**selagem 1**) a CryoTip **ao nível da Marca 1** (ou mesmo abaixo dela) e faça deslizar a manga de cobertura metálica novamente para baixo para cobrir e proteger a extremidade frágil da ponta.
 - Retire cuidadosamente o CryoTip do instrumento de aspiração e adaptador e, em seguida, vede termicamente (**Vedação n.º 2**) na extremidade larga do CryoTip **acima da Marca n.º 4**.
 - Mergulhe a CryoTip protegida directamente no azoto líquido (arrefecendo a uma velocidade de –12,000° C/ min) (ver Figura 6b).

Carregar e vedar a palhinha HSV da seguinte forma:

- Utilizando uma micropipeta, deposite cuidadosamente a(s) amostra(s) na calha da vareta capilar, a 1 mm da extremidade. A gota que transporta a(s) amostra(s) terá de ser inferior a 0,5 µl. Máximo de 2 óvulos ou embriões por cada vareta capilar.
- Coloque imediatamente a vareta capilar e o manuseador na palhinha e empurre até que a porção rectangular do manuseador fique em contacto com a extremidade dilatada da palhinha.
- Aperte ligeiramente a palhinha entre o dedo e o polegar e retire o dispositivo de inserção.
- Seguando ainda a palhinha no lugar, vede a extremidade aberta utilizando um vedante SYMS.
- Segure na palhinha com uma pinça na área da vareta de manuseamento.
- Mergulhe rapidamente toda a palhinha no LN₂ na vertical. Agite suavemente a palhinha no LN₂, durante alguns segundos, de forma a evitar a formação de uma camada de bolhas de ar isoladoras em redor da palhinha.
- Coloque o CryoTip vitrificado ou a palhinha HSV vitrificada no criotubo ou copo cheio de LN₂, mergulhado (na criovara). Tape o criotubo (ou copo) ou segure virado ao contrário com outro criotubo destapado, de modo a manter o CryoTip vitrificado ou palhinha HSV vitrificada em azoto líquido.
- Mova o reservatório LN₂ para perto do frio-congelador LN₂ e transfira a criocâmula com o seu conteúdo para o frio-congelador para uma conservação de longo-termo.

B. Protocolo de Vitrificação de EMBRIÕES (PN a blastocito):

- Dispense assepticamente uma gota de 50 µL de ES para uma tampa invertida de placa de Petri.
- Remova a placa de cultura com o(s) embrião(ões) da incubadora e verifique a sua qualidade ao microscópio. **Quando for possível, selecione apenas os embriões de melhor qualidade para vitrificação**
- Retire parte da solução ES (da gota de ES) para a pipeta de transferência e transfira cuidadosamente a amostra (até 2 de cada vez) com um volume mínimo de meio, da placa de cultura para a gota de ES e inicie o cronómetro. Os embriões devem equilibrar lentamente na gota de ES por queda livre durante 6-10 minutos.

Nota: O espécime vai encolher e depois gradualmente voltará ao seu tamanho

original, o que indica que o processo de equilíbrio está completo.

CUIDADO: Minimize a exposição do(s) espécime(s) à luz durante o processo de equilíbrio nas gotas de ES e VS.

- Durante o tempo de equilíbrio em ES:**
 - disponha (1) 50 µL gotas de solução VS conforme ilustrado na Fig. 7 e prepare o CryoTip ou Palhinha HSV para o carregamento.

Siga o protocolo com foi descrito acima (Secção A – Protocolo de vitrificação de Ócitos [MI]) a partir do passo até 16 para exposição às soluções VS, enchimento da CryoTip, mergulho em LN₂ e conservação a longo-termo.

Para detalhes adicionais sobre a utilização destes produtos, o laboratório deve consultar os seus próprios procedimentos padrão e protocolos que foram especificamente desenvolvidos e otimizados para a sua instituição.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Conserve os frascos selados refrigerados entre 2 °C e 8 °C. Quando armazenados como indicado, as soluções do Kit Vitrification Freeze são estáveis até o fim do prazo de validade que consta nos rótulos dos frascos.

Não utilize o meio além de oito (8) semanas após a abertura dos recipientes.

Como há material humano neste produto, ele pode desenvolver matéria patológica durante o armazenamento. Não se conhece nenhum efeito desse tipo de matéria particulada sobre o desempenho do produto.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este dispositivo deve ser utilizado por funcionários treinados em procedimentos aos quais se destina.

Como precaução acrescida durante o procedimento de preparação, recomendamos que cada CryoTip seja cuidadosamente examinada quando for retirada da embalagem. Antes de utilizá-las, as Cryotips devem ser examinadas sob uma ampliação adequada (40X) para inspecionar possíveis danos (tais como quebras ou fissuras) que podem ter ocorrido durante o transporte.

Não utilize um frasco de solução com partículas ou turvação.

Para evitar problemas com contaminação, manipule com técnica asséptica.

As soluções do Vitrification Freeze Kit contém o antibiótico sulfato de gentamicina. Devem ser tomadas as precauções adequadas para assegurar que o doente não é sensível ao antibiótico.

Actualmente a literatura de investigação indica que os efeitos a longo-termo da vitrificação sobre os embriões permanecem desconhecidos.

***Os derivados de sangue humano usados no fabrico deste produto foram testados por kits aprovados pela FDA, tendo-se comprovado serem não-reactivos ao antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpos à Hepatite C (HCv) e anticorpos ao Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH). No entanto, nenhum método de teste oferece uma garantia completa de que os produtos derivados de origem humana não sejam infecciosos. Manuseie todos os derivados de sangue humano como se fossem passíveis de transmitir infecções, utilizando precauções universais. Os dadores do material de origem foram ainda rastreados quanto ao risco de exposição à Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD).**

Não use nenhum frasco em que o embalamento esterilizado tenha sido comprometido.

CUIDADO: As leis federais dos EUA, restringem a venda deste dispositivo, apenas a médicos ou por sua prescrição.

ÚČEL POUŽITÍ

Sada Vit Kit® - Zmrazení je určena na použití při asistovaných reprodukčních technologiích pro vitifikaci a skladování lidských oocytů (MI) a embryí (zygot až blastocytů). Tato sada je určena pro použití s tyčinkou CryoTip® (katalogové č. 40709) nebo slámkou HSV Straw (katalogové č. 019921) společnosti Irvine Scientific a s vitrifikační rozmrazovací sadou VitRification Thaw Kit (Vit Kit® - Thaw) pro optimální získání vzorků.

POPIS VÝROBKU

Equilibration Solution-ES je HEPES pufovaný roztok média - 199, obsahující gentamicin sulfát (35 µg/ml), 7,5 % (v/v) dimetylsulfoxidu (DMSO), 15 % ethylenglykolu a 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement®.

Vitrifikační roztok (VS) je HEPES pufovaný roztok média - 199, obsahující gentamicin sulfát (35 µg/ml), 15 % (v/v) dimetylsulfoxidu (DMSO), 15 % ethylenglykolu, 20% (v/v) Dextran Serum Supplement® a 0,5 M sacharidu.

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

KONTROLA KVALITY

Roztoky v sadě Vit Kit-Freeze jsou filtrovány přes membránu a zpracovány asepticky podle výrobních metod, u kterých bylo ověřeno, že splňují hladinu zaručené sterilizace (SAL) 10⁻³.

Každá sada Vit Kit - Freeze podstoupí následující testy:Roztoky a tyčinky CryoTips Endotoxin pomocí metody testu Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Biokompatibilita testem embrya laboratorní myši (jednoduchého) Současné používání test na kontrolu sterility podle Farmakognozie Spojených států amerických <71>

Všechny výsledky se zaznamenávají do Dokladu o analýze konkrétní šarže, který je k dispozici na požádání.

NEODDÁNÝ, ALE NEZBYTNÝ MATERIÁL

- CryoTip® (katalogové č. 40709) nebo HSV Straw (katalogové č. 0019921) společnosti Irvine Scientific
- Konektor (katalogové č. 40736) společnosti Irvine Scientific nebo jiný adaptér
- Sterilní Petriho misky (50 x 9 mm, Falcon 351006 nebo obdobné)
- Kryo zkumavky (4,5 ml) nebo trubičky a kryto držáky
- Kulturní médium Modified HTF - HEPES (katalogové č. 90126) s přidáním bilkoviny
- Ochranné rukavice na jedno použití
- Injekční stříkačka Hamilton GASTIGHT® (50 µl, katalogové č. 80901) nebo jiný aspirační nástroj
- Převodné pipety (skleněné pipety z taženého skla nebo mikropipetové hroty s průměrem vnitřního hrotu ~200 µm)
- Pinzeta
- Impulse Heat Sealer
- Zapečetočovací zařízení SYMS Sealer pro slámky HSV Straw (katalogové č. 016296)
- Stopky nebo časovač
- Zásobník kapalného dusíku (Dewarova nebo polystyrenová nádoba s víkem, s objemem 1-2 l)
- Kapalný dusík (dostačující objem na dosažení hloubky 10,2 cm v zásobníku)

NÁVOD K POUŽITÍ

- Složky nezbytné při použití sady Vit Kit-Zmrazení (na aplikaci):
- Equilibration Solution (ES):
- 60 µl na vitrifikační protokol oocytu
- Nebo
- 50 µl na vitrifikační protokol embrya
- Vitrifikační roztok (VS):
- 50 µl na vitrifikační protokol
- 1 tyčinka CryoTip nebo slámkou HSV Straw (udrží až 2 vzorky)
- 1 Konektor

VITRIFIKAČNÍ PROTOKOL:

POZNÁMKA: Procedury by se měly provádět při pokojové teplotě (20-27 °C). **NEPOUŽÍVEJTE** vyhřívaný stolek mikroskopu po následující procedury. **POZOR:** Minimalizujte vystavování vzorku světlu během ekvilibrace v roztocích ES a VS.

- zajistěte aby množství roztoku (ES) a vitrifikačního roztoku (VS) dosáhlo pokojové teploty (20 -27 °C). **POZNÁMKA:** Neuvádějte opakované celé lahvičky roztoku ES a VS do pokojové teploty, když potřebujete vždy jen část jejich obsahu. Je vhodnější oddělit jen množství potřebné pro použití a ihned po oddělení vrátit lahvičku do prostředí s teplotou 2 - 8 °C. Modified HTF (HEPES) roztok s proteinem je také nutný pro vitrifikační protokol oocytu.
- Naplněte zásobník kapalného dusíku kapalným dusíkem tak, aby se dosáhlo hloubky 10.2 cm nebo aby byla kryotrubička nebo držák úplně ponořený) a položte její blízko mikroskopu. Připevňte kryt zkumavku nebo trubičku (otevřenou) ke spodní svorce kryo držáku a ponořte do kapalného dusíku pro přípravu na uskladnění vitrifikovaných vzorků.
- Určete počet vzorků na vitrifikaci.
- Označte každou sterilní petriho misku (nebo viko) a skladovací zařízení "Cryo" potřebnými informacemi.
- Opatrně dvakrát převratte každou ampulku ES a VS, aby se obsah před použitím promíchal.
- Připravte misku s kapkami roztoku na vitrifikační proceduru následovně:

A. Vitrifikační protokol OOCYT (MI)

POZNÁMKA: Vitrifikační protokol pro embryo najdete v Části B.

- Sterilním způsobem přeneste 20 µl pokles kulturního média Modified HTF - HEPES s bilkovinou a roztoku ES z malé vzdálenosti na ohráncovou vnitřní stranu víčka sterilní Petriho misky, jak je znázorněno na **obr. č. 1**, a položte misku na stolek mikroskopu:
 - jedna kapka (20 µl) média Modified HTF (HEPES s bilkovinou)
 - tí 20 µl kapky (celkem 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
- Vyjměte kulturní misku obsahující MII oocytu z inkubátoru a ověřte si kvalitu vzorků pod mikroskopem. **Kde je to možné, zvolte si pouze oocyt(y) stádia MI nejlepší kvality.** **POZOR:** Minimalizujte vystavování vzorku (vzorků) světlu během ekvilibrace v kapkách **H, ES a VS** .
- Převeďte oocytu (nanejvýš dvě najednou) s minimálním objemem média z kulturní misky (inkubátoru) do 20 µl kapky **H** na jednu minutu.
- Spojte kapku H s ES1 (viz obr. 1, šípka 1) hrotem přenosné pipety a umožněte spontánní smíšení těchto dvou roztoků po dobu **2 minut**.
- Poté spojte kapku roztoku ES2 (šípka 2) s dříve spojenými kapkami a ponechejte po dobu **2 minut**.
- Přeneste oocyt(y) s minimálním množstvím roztoku ze spojené kapky na kapku ES3 na dobu **6-10 minut**. **Poznámka:** ekvilibrace oocytu (oocytů) v ES3 je dokončena, když tloušťka mezery mezi zóna pellucida a vrstvou kolem žlutou (perivitelline) je stejná. Oocyt(y) se usadí na spodu kapky během 3 minut.

- Během ekvilibrační doby v ES3:**
 - Asepticky dejte jednu (1) 50 µl kapku VS 2 minuty před kompletním vyrovnáním a připravte tyčinku cryotip (obr. 3) nebo tyčinku HSV (obr. 4) pro naplnění:**
 - CryoTip:** připojení k injekční stříkačce Hamilton nebo vhodnému aspiračnímu nástroji s použitím konektoru nebo adaptéru pro zajištění těsného spojení. **POZNÁMKA:** Ponechte kovový kryt nasazený na jemný vytažený konec pro jeho ochranu, dokud nejste připraveni plnit vzorky.
 - HSV Straw:** připojení delšího konce modrého plastového zaváděcího přípravku ke zbarvenému konci manipulační tyčinky.
- Následující kroky (9-13) by měly být dokončeny během 90-110 vteřin. POZOR:** Vystavování vzorků VS roztoku by mělo být omezeno, aby se předešlo cytotoxicitě. Vzorky mají tendenci v roztoku VS plavat, proto si zaostřete mikroskop, abyste je mohli nepřetržitě sledovat během vystavení, a položte si hrot přenosné pipety po ruce, abyste mohli zabezpečit rychlý přenos mezi

kapkami VS. Viz obr. č. 5

- Po dokončení ekvilibrace v ES odeberte trochu ES do přenosné pipety a přeneste vzorek (vzorky) minimálního objemu z kapky ES do **kapky VS na 30 minut**.
- Naplněte a teplem zapečete tyčinku CryoTip podle následujícího popisu (viz obr. č. 6a):**
 - Vysušte kovový ochranný kryt směrem nahoru podél tyčinky CryoTip, abyste odhalili jemný křehký hrot.
 - Použitím tyčinky CryoTip a injekční stříkačky Hamilton za stálého pozorování pod mikroskopem, opatrně aspirujte malý objem VS po značku č. 1 na tyčince CryoTip.
 - Při trvalém sledování pod mikroskopem, opatrně aspirujte vzorek s VS po značku č. 2 na tyčince CryoTip.
 - Nyní porozuňte tyčinku CryoTip přímo a vysáním odeberte VS až po značku č. 3.
 - Vzorek musí být umístěn mezi značkou č. 2 a značkou č. 3.
 - Horkem zapečete (pečet č. 1) tyčinku CryoTip na znače č. 1 (nebo těsně pod ní) a přetáhněte kovový kryt směrem dolů na ochranu jemného křehkého hrotu.
 - Opatrně vyjměte tyčinku CryoTip z aspiračního nástroje a adaptéru a poté ji teplem zapečete (**Uzávěr č. 2**) na silnějším konci tyčinky CryoTip nad značkou **č. 4**.
 - Ponořte uzavřenou tyčinku CryoTip přímo do kapalného dusíku (chladiče se v poměru –12 000 °C/min) (viz obr. č. 6b).
- Naplněte a zapečete slámkou HSV Straw podle následujícího popisu:**
 - Pomocí pipety opatrně přeneste vzorek (či vzorky) do kanálku kapilárové tyčinky ve vzdálenosti 1 mm od konce. Kapka obsahující vzorek (či vzorky) musí být menší než 0,5 µl. Maximálně můžete použít 2 oocytu nebo embrya pro každou kapilárovou tyčinku.
 - Okamžitě vsuňte kapilárouv a manipulační tyčinku do slámky a zasouvejte dovnitř, dokud se obdelníková část manipulační tyčinky nedostane do kontaktu s rozšířeným koncem slámky.
 - Jemně stiskněte slámkou palcem a ukazovákem a vytáhněte zaváděcí přípravek.
 - Držte slámku v původní pozici a zapečete její otevřený konec pomocí zapečetovacího zařízení SYMS Sealer.
 - Držte slámkou pinzetou v prostoru manipulační tyčinky.
 - Rychle ponořte celou slámku ve svíslé poloze do kapalného dusíku (LN₂). Opatrně pohybujte slámkou v LN₂ po několik sekund, aby se kolem slámky nevytvářila izolační vrstva vzduchových bublin.
- Vložte vitrifikovanou tyčinku CryoTip nebo slámkou HSV Straw do ponořené kryozkumavky nebo trubičky (na kryo držáku) naplněné LN₂. Zazátkujte kryozkumavku (či trubičku) nebo ji připevňte v převrácené poloze k jiné neuzavřené kryozkumavce, aby byla vitrifikovaná tyčinka CryoTip nebo slámká HSV Straw bezpečně uložena v tekutém dusíku.
- Přineste zásobník kapalného dusíku (LN₂) blízko kryo mrazničky (LN₂), a převedte kryo držáky s jejich obsahem do kryo mrazničky na dlouhodobé skladování.

B. Vitrifikační protokol EMBRYÍ

(PN na Blastocyst):

- Sterilní metodou odkápněte jednu 50 µl kapku ES na vnitřní stranu obráceného víčka Petriho misky.
- Vyjměte kulturní misku obsahující embrya (embrya) z inkubátoru a ověřte si kvalitu vzorku (vzorků) pod mikroskopem. **Kde je to možné, zvolte si pouze embryo(a) nejlepší kvality pro vitifikaci.**
- Opatrně převedte vzorek (nanejvýš dva najednou) s minimálním objemem média z kulturní misky do kapky ES a spusťte časovač. Embrya by měla být ekvilibrována v kape ES pomalu volným pádem po dobu 6-10 minut. **Poznámka:** Vzorek se smrští a pak se postupně navrátí do původní velikosti, což bude indikovat dokončení ekvilibrace. **POZOR:** Minimalizujte vystavování vzorku (vzorků) světlu během ekvilibrace v kapkách ES a VS.
- Během této ekvilibrační doby v ES:**
 - Připravte (1) 50 µL kapky roztoku VS, jak je znázorněno na obr. č. 7 a připravte

CryoTip nebo HSV Straw pro naplnění.

Postupujte podle výše uvedených metod (Část A – Vitrifikační protokol oocytu [MI]) z kroku č. 8 po č.18, týkajících se vystavení roztoku VS, plnění tyčinek CryoTip, ponoření do kapalného dusíku (LN₂), a dlouhodobého skladování.

Pro dodatečné podrobnosti o použití těchto výrobků by každá laboratoř měla konzultovat vlastní laboratorní metody a protokoly, které byly vytvořeny a optimalizovány zvlášť pro váš konkrétní zdravotnický program.

POKYNY PRO UCHOVÁVÁNÍ A STABILITU: Neotevřené ampulky uchovávejte zmrazené při teplotě 2° C až 8° C. Při uchovávání podle pokynů jsou roztoky vitrifikační sady (VitRification Freeze Kit Solutions) stabilní až do data expirace, uvedeného na etiketách ampulek.

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

Protože je ve výrobku přítomen materiál z lidského zdroje, mohou se během skladování vytvořit částecí. O tomto typu částecek není známo, že by měl vliv na výkonnost výrobku.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Zařízení bylo určeno pro použití školeným personálem při zákrocích, které zahrnují indikovanou aplikaci, pro kterou je zařízení určeno.

Jako doplňkové opatření během přípravné procedury doporučujeme, aby byla každá tyčinka Cryotip opatrně zkontrolována po vyjmutí z obalu. Před použitím by měly být tyčinky CryoTips prohlédnuty pod vhodným zvětšením (40x), zda nedošlo k poškození (např. nalenomé hroty nebo praskliny) během přepravy.

Nepoužívejte žádné ampulky roztoku, které jeví známky přítomnosti částic hmoty nebo zakalení.

Vyhýňte se problémům kontaminace, při práci dodržujte aseptické metody.

Roztoky VitRification Freeze Kit obsahují antibiotikum gentamicin sulfát. Dodržujte příslušná opatření, abyste se ujistili, že pacient není alergický na toto antibiotikum.

V současné době výzkumná literatura indikuje, že dlouhodobý vliv vitrifikace na embrya není známý.

***Deriváty z lidské krve použité při výrobě tohoto produktu byly testovány pomocí testovacích sad v licenci amerického Úřadu pro potraviny a léčiva (FDA) a nebyla u nich zjištěna reakce na povrchový antigen viru HBV (HBsAg), protilátky na hepatitidu typu C (HCV) a protilátky na virus lidské imunodeficience (HIV). Platí však, že žádná metoda testování zcela nezaručuje, že produkty získané z humánních zdrojů jsou neinfekční. Nakládejte se všemi deriváty z lidské krve, jako by u nich byla možnost přenosu infekce, a používejte všeobecně platná preventivní opatření. Dárci zdrojového materiálu také prošli screeningem ohledně rizika vystavení Creutzfeldt-Jakobově nemoci (CJD).**

Nepoužívejte žádnou lahev s poškozeným sterilním balením.

POZOR: Federální zákony USA omezují prodej tohoto zařízení pouze na lékaře nebo na jeho předpis.

ANVENDELSE

Vit Kit® - Freeze er beregnet til brug ved assisteret reproduktionsprocedurer for vitrifikation og opbevaring af humane oocytter (MI) og embryoner (zygoter til blastocyster). Dette kit er designet til brug sammen med Irvine Scientifics CryoTip® (Katalognr. 40709) eller HSV-rør (Katalognr. 019921) og Vitrification Thaw Kit (Vit Kit® - Thaw) for optimal gendannelse af prøver.

PRODUKTBESKRIVELSE

Equilibration Solution-ES er en HEPES-bufret opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat (35 µg/ml), 7.5 % (vol/vol) af hver dimethylsulfoxid (DMSO) og ethylenglykol samt 20 % (vol/vol) Dextran Serum Supplement.

Vitrifikationsopløsning-VS er en HEPES-bufret opløsning af Medium-199 indeholdende gentamicinsulfat (35 µg/ml), 15 % (vol/vol) af hver dimethylsulfoxid (DMSO) og ethylenglykol, 20 % (vol/vol) Dextran Serum Supplement og 0,5 M saccharose.

Disse to opløsninger skal bruges i rækkefølge i henhold til den trinvisse protokol for vitrifikation af mikrodråber.

KVALITETSSIKRING

Opløsningerne i Vit Kit-Freeze er membranfiltrerede og aseptisk fremstillet iht. procedurer, som er blevet valideret og opfylder et sterilitetssikringsniveau (SAL) på 10⁻³.

Hvert parti Vit Kit - Freeze undergår følgende test:

Opløsninger og CryoTips.

- Endotoxin med Limulus Amebocyte Lysate-metoden (LAL)
- Biokompatibilitet ved analyse af musembrø (étcellet)
- Sterilitet med den aktuelle United States Pharmacopeia-test (USP) <7>

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

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Irvine Scientific CryoTip® (Katalognr. 40709) eller HSV-rør (Katalognr. 0019921)
- Irvine Scientific konnektor (Katalognr. 40736) eller en anden adapter
- Sterile petriskåle (50 x 9 mm, Falcon 351006 eller tilsvarende)
- Cryorør (4,5 ml) eller bægre og cryocaner
- Modified HTF - HEPES (Katalognr. 90126) dyrkningsmedium suppleret med protein
- Egangshandsker
- Hamilton GASTIGHT® sprøjte (50 µl, Katalognr. 80901) eller andet aspirationsredskab
- Transferpipetter (glaspipetter af trukket glas eller mikropipettespidser med en indvendig diameter i spidsen på ~200 µm)
- Pincet
- Impulse Heat Sealer
- SYM5-forsegler til HSV-rør (Katalognr. 016296)
- Stopur eller timer
- Beholder til flydende nitrogen (Dewar- eller Styrofoam-beholder med lag, 1-21 volumen)
- Flydende nitrogen (tilstrækkelig volumen til at få en dybde på 10,2 cm i beholderen)

BRUGSANVISNING

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

- Equilibration Solution (ES): 60 µl til **vitrifikation af oocytter eller** 50 µl til **vitrifikation af embryoner**
- Vitrifikationsopløsning (VS): 50 µl til **vitrifikation**
- 1 CryoTip eller HSV-rør (**kan opbevare op til 2 prøver**)
- 1 konnektor

VITRIFIKATIONSPROTOKOL:

BEMÆRK: Procedurerne skal udføres ved **stuetemperatur (20-27 °C)**. **BRUG IKKE et opvarmningsmikroskop til følgende procedurer.** **FORSIGTIG: Minimer udsættelse af prøver for lys under ekvilibrerung i ES og VS opløsninger.**

- Bring den mængde af opløsning til ækvilibrering (ES) og opløsning til vitrificering (VS), som skal anvendes, til stuetemperatur (20 - 27 °C). **BEMÆRK:** Undgå at hele hætteglassene med ES og VS opnår stuetemperatur gentagne gange, da en del af opløsningen behøves hver gang. Det er bedre at udportionere den mængde, der skal anvendes, og returnere hætteglassene til 2 - 8 °C lige efter udportionering. Modified HTF (HEPES) med protein er også påkrævet til vitrifikation af oocytter.
- Fyld nitrogenbeholderen med flydende nitrogen (tilstrækkeligt til at få en dybde på 10,2 cm eller til helt at kunne nedsænke cryorøret på cryocanen) og sæt den ved siden af mikroskopet. Sæt et cryorør eller bæger (uden låg) fast i den nederste klemme på en cryoholder og nedsænk den i det flydende nitrogen som forberedelse til opbevaring af de vitrificerede prøver.
- Fastsæt det antal prøver, der skal vitrificeres.
- Sæt en etiket med de nødvendige oplysninger på hver steril petriskål (eller låg) og hver Cryo opbevaringsbeholder.
- Vend forsigtigt hvert hætteglas med ES og VS om to gange for at blande indholdet inden brug.
- Forbered skålen med dråber af opløsning til vitrifikation som følger:

A. Protokol for vitrifikation af OOCYTTER (MI): **BEMÆRK:** Se afsnit B for at se protokollen for vitrifikation af embryoner.

- Dispenser aseptisk 20 µl dråbe af dyrkningsmediet, Modified HTF - HEPES med protein, og ES i nærheden af et omvendt låg på en steril petriskål, som vist i figur 1, og placer skålen på mikroskopslets platform:
 - en 20 µl dråbe Modified HTF (HEPES med protein)
 - tre 20 µl-dråber (60 µl i alt) af ES (ES1, ES2, ES3)
- Fjern dyrkningskålen med MI-oocytterne fra inkubatoren og kontroller prøvernes kvalitet under mikroskop. Når det er muligt, **vælg**es kun **oocyt(ter)** af **den bedste kvalitet på MIII-stadiet**.
- FORSIGTIG: Minimer udsættelse af prøve(r) for lys under ekvilibrerung i H-, ES- og VS-dråber.**
- Overfør oocytten (op til 2 ad gangen) med en minimal volumen af mediet fra dyrkningskålen (i inkubatoren) ind i 20 µl-dråben af **H** i et minut.
- Lad H-dråben flyde sammen med ES1 (se fig. 1, pil 1) vha. spidsen på transferpipetten og tillad spontan blanding af de to opløsninger i **2 minutter**.
- Bland derefter dråben af ES2 (pil 2) med de tidligere blandede dråber og lad den stå i **2 minutter**.
- Overfør oocytten/oocytterne med minimal volumen af opløsningen fra den sammenflydte ES3-dråbe i **6-10 minutter**. **Bemærk: Ekvilibrering af oocyt(ter) i ES3 er færdig, når tykkelsen på zona pellucida og det perivitelline mellemrum har samme størrelse. Oocytten/oocytterne vil bundfælde i bunden af dråben inden for 3 minutter.**
- Under ekvilibreringstiden i ES3:** **Anvend aseptisk teknik og dispenser (1) 50 µl dråbe VS 2 minutter inden fuldført ekvilibrerung og forbered CryoTip'en (fig. 3) eller HSV-strået (fig. 4) til at blive fyldt:**
 - CryoTip:** tilsutter til Hamiltonsprøjten eller det passende aspirationsredskab ved hjælp af en konnektor eller adapter for at sikre en tæt forsegling. **BEMÆRK:** Hold dækhætten af metal over den fine trukne spids for at beskytte den, indtil du er klar til at indsætte prøver.
 - HSV-rør:** forbinder den lange ende af den blå indføringsanordning af plastik til den farvede ende på håndteringsstangen.
- Følgende trin (9-13) skal udføres på **90-110 sekunder**. **FORSIGTIG:** Eksponering af prøver for VS skal begrænses for at forhindre cytotoxicitet. **Prøven/prøverne har tendens til at flyde i VS.** Derfor skal fokus justeres på mikroskopet for at vedligeholde kontinuerlig visualisering under eksponering. Hold spidsen af transferpipetten tæt på for at sikre hurtig overførsel mellem VS-dråberne. **Se figur 5.**
- Når ekvilibrerung i ES er færdig, trækkes noget ES op i transferpipetten. Overfør prøven/prøverne med minimal volumen fra ES-dråben til **dråbe VS i 30 sekunder**.
- Indfør** og varmforsøgl CryoTip'en som

følger (Se figur 6a):

- Træk beskyttelsesmanchetten af metal op over CryoTip'en, indtil den tynde, skrøbelige spids stikker ud.
- Håndter CryoTip og Hamilton-sprøjten under mikroskopisk observation og aspirer forsigtigt en lille volumen VS til **mærke nr. 1** på CryoTip.
- Fortsæt observation under mikroskopet og aspirer forsigtigt prøven med VS til **mærke nr. 2** på CryoTip.
- Observer nu CryoTip direkte og aspirer mere VS til **mærke nr. 3**.
- Proven skal være fyldt i mellem **mærke nr. 2 og nr. 3**.
- Luk CryoTip vha. varmforsøgling (**forsegling nr. 1**) på (eller lige under) **mærke nr. 1** og træk beskyt telesmanchetten ned igen for at beskytte den tynde, skrøbelige spids.
- Fjern forsigtigt CryoTip'en fra aspirationsredskabet og adapteren og varmforsøgl derefter (**Forsegling nr. 2**) i den tykke ende af CryoTip'en oven **Mærke nr. 4**.
- Nedsænk den lukkede CryoTip direkte i det flydende nitrogen (kølingshastighed på ~12.000 °C/min.) (se figur 6b).

Indsæt og forsegl HSV-røret som følger:

- Brug en mikropipette til omhyggeligt at deponere prøven(erne) i rillen på kapillarrøret 1 mm fra enden. Dråben, der holder prøven(erne) skal være under 0,5 µl. Maksimalt 2 oocytter eller embryoner for hvert kapillarrør.
- Placer øjeblikkeligt kapillarrøret og håndteringsanordningen i røret og skub indtil den firkantede del af håndteringsanordningen kommer i kontakt med den kegleformede ende på røret.
- Klem forsigtigt røret mellem tommel- og pegefinger og fjern indføringsanordningen.
- Mens du stadig holder røret på plads, skal du forsegle den åbne ende med en SYMS-forsegler.
- Hold røret ved hjælp af en pincet i håndteringsstangens område.
- Tryk hurtigt hele røret vertikalt ind i LN₂. Ryst forsigtigt røret i cirkelbevægelser i LN₂ i et par sekunder for at undgå dannelsen af et isolerende luftboblelag omkring røret.

- Placer den vitrificerede CryoTip eller HSV-rør i det nedsænkede LN₂ fyldte cryorør eller bægeret (på cryocane). Sæt låg på cryorørret (eller bægeret) eller sæt det på med bunden i vejret med et andet cryorør uden hætte for at fastgøre det vitrificerede CryoTip eller HSV-rør i flydende kvælstof.
- Flyt beholderen med flydende nitrogen (LN₂) hen ved siden af LN₂-cryofryseren og overfør cryocane med dråbs indhold til cryofryseren med henblik på langtidsoptbevaring.

B. EMBRYONER (PN til blastocyster), vitrifikationsprotokol:

- Brug aseptisk teknik og dispenser 50 µl dråber ES på et omvendt låg til en petriskål.
 - Fjern dyrkningskålen med embryoner(er) fra inkubatoren og kontroller prøvens/prøvernes kvalitet under mikroskop. **Når det er muligt, vælg**es kun **embryon(er)** af **den bedste kvalitet til vitrifikation**.
 - Overfør forsigtigt prøven (op til to på én gang) med en minimal volumen af mediet fra dyrkningskålen til ES-dråben, og start timeren. Embryoner skal ekvilibreres langsomt ved frit fald i ES-dråben i 6-10 minutter. **Bemærk: Prøven vil skrumpe og derefter gradvist vende tilbage til dens oprindelige størrelse, hvilket angiver, at ekvilibrerung er fuldført.**
- FORSIGTIG: Minimer udsættelse af prøve(r) for lys under ekvilibrerung i ES- og VS-dråber.**
- Under ekvilibreringstiden i ES-dråben:**
 - anbring (1) 50 µL dråber VS-opløsning som vist i fig. 7 og forbered CryoTip eller HSV-røret til indføring.

Følg protokollen som angivet ovenfor (Afsnit A – Vitrifikationsprocedure for oocytter [MI]) fra trin 8 til 16 med henblik på eksponering for VS-opløsninger, fyldning af CryoTips, nedsænkning i flydende nitrogen (LN₂) og langtidsoptbevaring.

For yderligere oplysninger om brug af disse produkter skal hvert laboratorium henvise til egne procedurer og protokoller, som er blevet specifikt udviklet og optimeret til laboratoriets eget, medicinske program.

ANVISNINGER FOR OPBEVARING OG STABILITET:

Uåbnede hætteglas opbevares nedkølet ved 2-8 °C. Når Vitrification Freeze Kit-opløsninger opbevares som anvist, er produkterne stabile indtil udløbsdatoen på flaskernes etiketter

Mediet må ikke bruges i mere end otte (8) uger, hvis beholdere har været åbnet.

Eftersom der er humant kildemateriale i produktet, kan det udvikle partikler under opbevaring. Det vides ikke, om denne type partikler påvirker produktets ydeevne.

FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER

Dette udstyr er beregnet til brug af personale, der er uddannet i procedurer, der inkluderer den indendirekte anvendelse, som dette udstyr er beregnet til.

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

Anvend ikke hætteglas med opløsninger, der indeholder partikler eller er uklare.

Undgå problemer med kontamination ved at bruge aseptiske tekniker.

Vitrification Freeze Kit-opløsninger indeholder antibiotikummet gentamicinsulfat. Passende forholdsregler skal overholdes for at sikre, at patienten ikke er sensibiliseret mod dette antibiotikum.

Langtidsvirkningerne af vitrifikation af embryoner forbliver ukendt ifølge forskningslitteraturen.

***Humane blodprodukter anvendt i fremstillingen af dette produkt er blevet testet med kit licenseret af FDA og fundet at være ikke-reaktive over for hepatitis B-overfladeantigen (HBsAg), antistoffer mod hepatitis C (HCV) og antistoffer mod human immundefekt virus (HIV). Der findes dog ingen testmetoder, som kan give fuldstændig garanti for, at produkter udvundet fra humane kilder er ikke-infektøse. Alle humane blodprodukter skal håndteres, som om de var i stand til at overføre infektion, ved at tage universelle forholdsregler. Donorer af kildematerialet er desuden blevet screenet for risiko for eksponering for Creutzfeldt-Jakobs sygdom (CJD).**

Anvend ikke nogen flasker, hvor den sterile emballage er blevet kompromiteret.

FORSIGTIG: Ifølge amerikansk lov (USA) må dette produkt kun sælges af eller efter ordination af en læge.

SUOMI

KÄYTTÖTARKOITUS

Vit Kit® Freeze on tarkoitettu avusteisten lisääntymismenettelyjen yhteydessä suoritettavana ihmisen oosyyttien (MI) ja alkoiden (tsygootista blastokystaan) vitrifikaatioon ja säilytykseen. Tämä pakkaus on tarkoitettu käytettäväksi Irvine Scientificin tuotteiden CryoTip®- (tuotenro 40709) tai HSV-pilli (tuotenro 019921) ja vitrifikaation sulatuspakkauksen (Vit Kit® - Thaw) kanssa näytteen optimaaliseen talteenottoon.

TUOTTEEN KUVAUS

Equilibration Solution-ES on HEPES-puskuroitu Medium-199-liuos, jossa on gentamisiinisulfattia (35 µg/ml), 7,5 % (tilav./tilav.) sekä dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja etyleeniglykolia kumpaakin ja 20 % (tilav./tilav.) Dextran Serum Supplement.

Vitrifikaatioliuos VS on HEPES-puskuroitu Medium-199 liuos, joka sisältää gentamisiinisulfattia (35 µg/ml), 15 % (v/v) kutakin dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja etyleeniglykolia, 20 % (v/v) Dextran Serum Supplementia ja 0,5 M sukroosia.

Näitä kahta liuosta käytetään järjestyksessä asteittaisen mikropisaroiden vitrifikaatioprotokollan mukaisesti.

LAADUNVARMISTUS

Vit-setin Freeze -liuokset on kalvosuodatettu ja aseptisesti käsitellyt valmistusvaatimusten mukaisesti, jotka on vahvistettu steriliteettiasia (SAL) 10⁻³ vastaaviksi.

Jokainen Vit Kit - Freeze-erä testataan seuraavasti:

Liuookset ja CryoTip.

- Endotoksiini Limulus-amebosoosytitysaatti -menetelmällä (LAL)
- Biohyteensopivuus hiiren alkion analyysillä (yksi solu)
- Steriliteetti Yhdysvaltain nykyisen farmakopean steriilit estin mukainen <71>

Kaikki tulokset raportoidaan eräkohtaisesti analyysitodistuksella, joka on pyynnöstä saatavissa.

TARVITTAVA MATERIAALI, JOTA EI OLE MUKANA

- Irvine Scientific CryoTip®- (tuotenro 40709) tai HSV-pilli (tuotenro 0019921)
- Irvine Scientific -liitin (tuotenro 40736) tai muu sovitin
- Steriliit petrimaljat (50 X 9 mm, Falcon 351006 tai vastaavat)
- Kryoputket (4,5 ml) tai kuperapohjaiset putket ja kryolineet
- Modified HTF- HEPES -viljelyliuos (tuotenro 90126), johon on lisätyä proteiinia
- Kertakäyttökäsinet
- Hamilton GASTIGHT® -ruisku (50 µl, tuotenro 80901) tai muu aspirointiväline
- Siirtopipetit (vedetyt lasipipetit tai mikropipettkärjet, joiden sisäipipmita on ~ 200 µm)
- Pinsetit
- Impulse Heat Sealer
- SYMS-saumaaja HSV-pillille (tuotenro 016296)
- Sekuntikello tai ajastin
- Nestetyppisäiliö (kannellinen Dewar- tai vaahotomuvisäiliö, tilavuus 1 - 2 l)
- Nestetyyppi (riittävä määrä täyttämään säiliö n. 10 cm:n syvyydellä)

KÄYTTÖOHJEET

Vit Kit Freeze-setin osa-ainevaatimukset (sovelluksen mukaan):

- Equilibration Solution (ES):
 - 60 µl oosyytin vitrifikaatiokäsittelyyn tai
 - 60 µl alkion vitrifikaatioprotokolla
- Vitrifikaatioliuos (VS):
 - 50 µl vitrifikaatioprotokollaa varten
 - 1 CryoTip tai HSV-pilli (säilyttää korkeintaan 2 näytettä)
 - 1 liitin

VITRIFIKAATIOPROTOKOLLA:

HUOM: Toimenpiteet tulee suorittaa huoneenlämmössä (20 – 27 ° C). **ÄLÄ** käytä kuumennettua mikroskoopin objektipöytää seuraavissa toimenpiteissä. **VAROITUS:** Minimoi näytteen altistuminen valolle sen tasapainotuksen aikana ES- ja VS-liuoksissa.

- Anna tarvittavan määrän tasapainoliuosta (ES) ja vitrifiointiliuosta (VS) savuttaa huoneenlämpö (20–27 °C). **HUOM:** Älä anna ES- ja VS-puljojen koko sisällön lämmetä toistuvasti huoneenlämpöiseksi, jos kerralla tarvitaan vain osa liuoksesta. On parempi jakaa käytettävä määrä yhtä suuriin osiin ja palauttaa pullo välittömästi takaisin 2–8 °C:n lämpötilaan tämän jälkeen. Modified HTF:tä (HEPES) ja proteiinia tarvitaan myös oosyyttien vitrifikaatioprotokollassa.
- Täytä nestetyypisäiliö nestetyellä (n. 10 cm syvyydeltä, jotta kryoputki tielineessä on täysin upoksissa) ja aseta se lähelle mikroskooppia. Kiinnitä kryoputki tai kuperapohjainen putki (avoimena) kryotelineen pohjakiinnikkeeseen ja upota se nestetytteen valmiina vitrifioitujen näytteen talteen säilyttävä varten.
- Määritä, kuinka monta näytettä tullaan vitrifioimaan.
- Merkitse jokaiseen steriiliin petrimalja (tai kanteen) ja Cryo-säilytyslaitteeseen tarvittavat tiedot.
- Käännä kukin ES- ja VS-pullo kevyesti kaksi kertaa ylösalaisin, jotta niiden sisältö sekoittuu ennen käyttöä.
- Valmistele malja, jossa on liuosten pisaroita, vitrifikaatiota varten seuraavasti:

A. OOSYYTIN (MI) vitrifikaatioprotokolla:

HUOM: Alkion vitrifikaatioprotokolla löytyy osasta B.

- Tiputa aseptisesti 20 µl tippa viljelyliuosta, Modified HTF - HEPES:tä, johon on lisätyä proteiinia, ja ES:ää steriiliin petrimaljaan ylösalaisin käännetylle kannelle hyvin läheltä kanta (**ks. kuva 1**) ja aseta malja mikroskoopin objektipöydälle:
 - yksi 20 µl tippa Modified HTF:ää (HEPES, johon on lisätyä proteiinia)
 - kolme 20 µl:n tippaa (yhteensä 60 µl) liuosta ES (ES1, ES2, ES3)
- Poista MI-oosyyttejä sisältävä viljelymalja inkubaattorista ja tarkista näytteiden laatu mikroskoopilla. Mikäli mahdollista, **valitse vain parhaanlaatuinen MI-asteinen oosyytti (oosyytit).** **VAROITUS:** Minimoi näytteen (näytteiden) altistuminen valolle sen tasapainotuksen aikana H-, ES- ja VS-tipoissa.
- Siirrä oosyytti (korkeintaan kaksi kerrallaan) minimaalisen ravintoliuostilavuuden kanssa viljelymaljasta (inkubaattorissa) 20 µl:n H-tippaan yhdeksi minuutiksi.
- Yhdistä H-tippa ja ES1 (ks. kuva 1, nuoli 1) siirtopipetin kärjellä ja anna niiden kahden liuoksen sekoittua itsestään **2 minuutin** ajan.
- Yhdistä sitten tippa ES2:ta (nuoli 2) aikaisemmin yhdistettyihin tippoihin ja anna levätä 2 minuutin ajan.
- Siirrä oosyytti (oosyytit) mahdollisimman pienessä liuostilavuudessa yhdistetystä tipasta ES3-tippaan **6–10 minuutin** ajaksi. **Huom: Oosyytin (oosyyttien) tasapainotus ES3:ssa on valmis, kun zona pellucida ja perivitelliiniliitä ovat yhtäläiset. Oosyytti (oosyytit) laskeutuu tipan pohjalle 3 minuutissa.**
- Tasapainotuksen aikana ES3:ssa:**
 - Jaa aseptisesti yksi (1) 50 µl:n tippa VS:ää 2 minuuttia ennen täydellistä tasapainottumista ja valmistaa CryoTip (kuva 3) tai HSV-putki (kuva 4) lataamista varten:**
 - CryoTip:** yhdistäminen Hamilton-ruiskuun tai soveltuvan aspirointivälineeseen liittimen tai sovitimen avulla riittävän tiiviiden varmistamiseksi. HUOM: Pitele metallista suojusholkkia ohuen, kapean kärjen päällä suojataksesi sitä, kunnes näytteet ovat valmiita ladattaviksi.
 - HSV-pilli:** sinisen, muuista valmistetun asettimen pidemmän päään liittäminen käsittelysauvan väriiniseen päähän.
- Seuraavat vaiheet (9 – 13) tulee suorittaa 90 - 110 sekunnissa. VAROITUS:** Tasapainotuksen alitustumista VS:lle tulee rajoittaa sytotoksisuuden välttämiseksi. Näyte (näytteet) pyrkivät kellumaan VS:ssä, joten mikroskoopin polttopistettä tulee säätää jatkuvan tarkkailun ylläpitämiseksi ja siirtopipetin kärkeä pitää ulottuvalla VS-tippojen välisiä pikaisia siirtoja varten. **Katso kuvaa 5.**
- Kun tasapainotus ES:ssä on valmis, aspiroi hienan ES:tä siirtopipetillä ja siirrä näyte (näytteet) minimiliuovuudessa

ES-tipasta ensimmäisen **VS-tipan 30 sekunnin ajaksi.**

10. Lataa ja kuumasauamaa CryoTip seuraavasti (ks. kuva 6a):

- Sujuta metallista suojusholkkia ylöspäin pitkin CryoTipiä, jolloin sen ohut, hauras kärki paljastuu.
- Mikroskooppitarkastelun aikana, käytäten CryoTipiä ja Hamilton-ruiskua, aspiroi varovasti pieni määrä VS:ää CryoTipin **merkkiin 1** saakka.
- Jatka tarkastelua mikroskooppia ja aspiroi näyte ja VS varovasti CryoTipin **merkkiin 2** saakka.
- Tarkastele nyt suoraan CryoTipiä ja aspiroi lisää VS:ää **3. merkkiin** saakka.
- Näytteen on oltava **2. ja 3. merkin** välissä.
- Kuumasauamaa (**sinetti 1**) CryoTip **merkin 1** kohdalta (tai heti sen alta) ja sujuta suojusholki takaisin alas peittämään ja suojaamaan ohutta, helppä vahingoittuvaa kärkeä.
- Irrota CryoTip varovasti aspirointivälineestä ja sovittimesta ja kuumasauamaa (**sinetti nro 2**) CryoTipin paksummasta päästä merkin nro 4 yläpuolelta.
- Upota suljettu CryoTip suoraan nestetytpeen (jäähdytysnopeus ~12 000 °C/min) (ks. kuva 6b).

Lataa ja kuumasauamaa HSV-pilli seuraavasti:

- Aseta näyte (näytteet) varovasti mikropipetin avulla kapillaarintangon uraan 1 mm etäisyydelle kärjestä. Näytteen (näytteet) säilyttävään tipan on oltava tilavuudeltaan alle 0,5 µl. Enintään 2 oosyyttiä tai alkioita kutakin kapillaarintankoa kohden.
- Aseta kapillaarintanko ja käsittelysauva välittömästi pilliin ja työnnä, kunnes käsittelysauvan suoraikateen muotoinen osa kohtaa pillin laajenevan puolen.
- Purista pilliä kevyesti peukalon ja etusormen välissä ja irota asetin.
- Pidä pilliä edelleen paikoillaan ja saumaa avonainen pää SYMS-saumaajalla.
- Pitele pilliä pinsettillä käsittelysauvan kohdalta.
- Työnnä koko pilli nopeasti pystyasennossa nestetytpeen (LN₂). Sekoita varovasti pilliä nestetytässä (LN₂) muutaman sekunnin ajan, jotta pillin ympärille ei muodostuisi eristävää limakuplakerrosta.
- Aseta vitrifioitu CryoTip- tai HSV-pilli upotettuun, nestetytellä (LN₂) täytettyyn kryoputkeen tai kuperapohjaiseen putkeen (kryotelineessä). Sulje kryoputki (tai kuperapohjainen putki) tai kiinnitä se ylösalaisin avoimeen kryoputkeen, jotta vitrifioitu CryoTip- tai HSV-pilli pysyisi nestetytässä.
- Siirrä nestetyypisäiliö (LN₂) lähelle LN₂-kryopakastinta ja siirrä kryoteline sisältöineen kryopakastimeen pitkäaikais säilytystä varten.

B. ALKIOIDEN (PN blastokystaan) vitrifikaatioprotokolla:

- Tiputa aseptisesti yksi 20 µl:n tippa ES:ää petrimaljan ylösalaisin käännetylle kannelle.
- Poista viljelymalja alkioineen inkubaattorista ja tarkista näytteen (näytteiden) laatu mikroskoopilla. **Mikäli mahdollista, valitse vain parhaanlaatuinen alkio (alkiot) vitrifikaatioon.**
- Siirrä näyte varovasti (korkeintaan kaksi kerrallaan) minimimääräisine ravintoliuoksineen viljelymaljasta ES-tipan **PÄÄLLE** ja käynnistä ajastin. Alkiot tulee tasapainottaa ES-tipassa hitaasti vapaasti pudottaen 5 – 15 minuuttia.
- Huom:** Näyte kutistuu ja palaa sitten vähitellen alkuperäiseen kokoon meriksi, että tasapainotus on valmis. **VAROITUS:** Minimoi näytteen (näytteiden) altistuminen valolle sen tasapainotuksen aikana ES- ja VS-tipoissa.
- Tämän ES:ssä tasapainottamisen aikana:
 - **ota (1) 50 µL tippaa VS-liuosta (ks. kuva 7) ja valmistele CryoTip- tai HSV-pilli lataamista varten.**

Noudata yllä (osassa A - Oosyytin [MI] vitrifikaatioprotokolla) annettujen ohjeiden vaiheita 8 – 16, joissa selvitetään altistus VS-liuoksille, CryoTipin lataaminen, nestetytpeen (LN₂) upottaminen ja pitkäaikainen säilytys.

Lisätietoja näiden tuotteiden käytöstä kunkin laboratorion tulee hakea omista menettelyohjeistaan ja protokollista, jotka on erityisesti kehitetty ja optimoitu paikallista lääkinnällistä ohjelmaa varten.

SÄILYTYSOHJEET JA STABIILIUUS:

Säilytä avaamattomia ampulleja jääkaapissa, lämpötilassa 2–8 °C. Ohjeiden mukaisesti säilytetynä lasitus-jäädytyspakkauksen liuokset ovat stabiileja ampullien etiketissä olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti.

Elatusaineita saa käyttää korkeintaan kahdeksan (8) viikkoa säiliöiden avaamisesta lukien.

Koska tuotteessa on läsnä ihmisperäistä materiaalia, siihen voi ilmaantua jonkin verran hiukkasmaista aineista säilytyksen aikana. Tämän hiukkasmaisen aineksen ei tiedetä vaikuttavan tuotteen toimivuuteen.

VAROITUKSIA JA VAROTOIMENPITEITÄ

Tämä laite on tarkoitettu sellaisten henkilöiden käytettäväksi, jotka on koulutettu suorittamaan toimenpiteitä, joihin kuuluu laitteen käyttöätoituksien mukainen asianmukainen käyttö.

Lisävarotoimenpiteenä valmistelun aikana suosittelemme, että kukin CryoTip tarkastetaan huolellisesti, kun se otetaan pakkauksesta. Ennen käyttöä CryoTipit tulee tarkastaa sopivala suurennuksella (40 x) mahdollisen kuljetuksen aikana sattuneen vaurion varalta (kuten esim. kärjen rikkoutuminen tai säröt).

Älä käytä ravintoliuospulloa, jossa näkyy hiukkasia tai joka on sameaa.

Kontaminaatio-ongelmat vältetään aseptisellä käsittelytekniikalla.

Vitrification Freeze Kit-liuokset sisältävät antibiootti gentamisiinisulfattia. Tarkoituksenmukaisia varotoimenpiteitä on noudatettava, jotta potilas ei herkisty tälle antibiootille.

Tällä hetkellä tutkimuskirjallisuuden mukaan alkoiden vitrifikaation pitkäaikaisvaikutuksia ei tunneta.

***Tämän tuotteen valmistuksessa käytetyt ihmisveren johdannaiset on testattu käyttäen FDA:n lisensoimia testipakkauksia ja ne on todettu ei-reaktiivisiksi hepatiitti B:n pinta-antigeenille (HBsAg), hepatiitti C:n (HCV) vasta-aineille ja ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) vasta-aineille. Mikään testausmenetelmä ei kuitenkaan anna täyttä varmuutta siitä, että ihmisperäiset tuotteet olisivat tartuttamattomia. Käsitlet ihmisveren johdannaisia niin kuin ne voisivat aiheuttaa tartuntaa ja noudata yleisiä varotoimia. Lähdemateriaalin luovuttajat on myös seulottu Creutzfeldt-Jakobin taudin (CJD) altistusriskin varalta.**

Pulloa ei saa käyttää, jos sen steriili pakkaus on vahingoittunut.

VAROITUS: Yhdysvaltain liittovaltion laki rajoittaa tämän välineen myynnin vain lääkärin toimesta tai määräyksestä tapahtuvaksi.

BEDOELD GEBRUIK

Vit Kit® - Freeze (invriesmiddel) is bestemd voor gebruik bij geassisteerde voorplantingsprocedures voor de vitrificatie en opslag van menselijke oöcyten (MI) en embryo's (zygoot tot blastocyst). Deze kit is bestemd voor gebruik met de CryoTip® (catalogusnr. 40709) of het HSV-buisje (catalogusnr. 019921), en de Vitrificatie-ontdooikit (Vit Kit® - Thaw) van Irvine Scientific voor optimale terugwinning van monsters.

PRODUCTBESCHRIJVING

Equilibration Solution-ES is een HEPES gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat (35 µg/ml), 7,5% (v/v) van elk dimethylsulfoxide (DMSO) en ethyleenglycol en 20% (v/v) Dextran Serum Supplement* bevat.

Vitrificatieoplossing-VS is een HEPES gebufferde oplossing van Medium-199 die gentamicinesulfaat (35 µg/ml), 15% (v/v) van elk dimethylsulfoxide (DMSO) en ethyleenglycol, 20% (v/v) Dextran Serum Supplement* en 0,5 M sucrose bevat.

Deze drie oplossingen moeten achtereenvolgens worden gebruikt volgens het stapsgewijze microdruppelvitrificatieprotocol.

KWALITEITSBORING

De oplossingen in de Vit Kit-Freeze zijn membraangefilterd en op aseptische wijze bewerkt volgens productieprocedures die zijn gevalideerd voor een Sterility Assurance Level (SAL) van 10⁻³.

Elke partij Vit Kit - Freeze ondergaat de volgende testen:

- Oplossingen en CryoTips.
- Endotoxine door de Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-methode
- Biocompatibiliteit door muiseembryoassay (eencellig)
- Steriliteit volgens de huidige Amerikaanse Pharmacopeia Sterility Test <71>

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

VEREISTE, MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

- Irvine Scientific CryoTip® (catalogusnr. 40709) of HSV-buisje (catalogusnr. 019921)
- Irvine Scientific Connector (catalogusnr. 40736) of een andere adapter
- Steriele petrischalen (50 X 9 mm, Falcon 351006 of gelijkwaardig)
- Cryobuisjes (4,5 ml) of bekens en cryohouders
- Gewijzigd HTF - HEPES (catalogusnr. 90126) kweekmedium aangevuld met eiwit
- Wegwerphandschoenen
- Hamilton GASTIGHT®-spuit (50 µl, catalogusnr. 80901) of een ander opzuiginstrument
- Transferpijpetten (geblazen glazen pipetten of micropipetpunten met een inwendige puntdiameter van ~200 µm)
- Pinctel
- Impuls-heatsealer
- SYMS-afsluter voor HSV-buisje (catalogusnr. 016296)
- Stopwatch of timer
- Stap met vloeibare stikstof (Dewar- of Styrofoam- container met deksel en een inhoud van 1-2 l)
- Vloeibare stikstof (voldoende volume voor een tankvulling van 10 cm (4 inch))

GEBRUIKSAANWIJZING

Vit Kit-Freeze componenten (per toepassing):

- Equilibration Solution (ES): 60 µl voor **oöcytvitrificatieprotocol** Of 50 µl voor **embryovitrificatieprotocol**
- Vitrificatieoplossing (VS): 50 µl voor **vitrificatieprotocol**
- 1 CryoTip of het HSV-buisje (**bevat max. 2 monsters**)
- 1 Connector

VITRIFICATIEPROTOCOL:

OPM.: de procedures moeten worden uitgevoerd bij omgevingstemperatuur (20-27 °C). Gebruik de verwarmde microscoopfase NIET voor de volgende procedures. VOORZICHTIG: beperk de blootstelling van monsters aan licht tijdens equilibratie in ES en VS oplossingen tot een minimum.

- Breng de benodigde hoeveelheid equilibratieoplossing (ES) en vitrificatieoplossing (VS) op omgevingstemperatuur (20-27 °C). **OPMERKING:** Laat niet de gehele ampullen met

ES en VS steeds op omgevingstemperatuur komen als u elke keer maar een deel van de oplossing nodig heeft. Het is beter om de benodigde hoeveelheid te doseren en de ampullen meteen na dosering opnieuw bij 2-8 °C te bewaren. Modified HTF (HEPES) met eiwit is ook vereist voor het oöcytvitrificatieprotocol.

- Vul de vloeibare-stikstofank met vloeibare stikstof (voldoende voor een diepte van 10 cm (4 inch) of om het cryobuisje aan de cryohouder volledig onder te dompelen) en plaats deze dichtbij de microscoop. Bevestig een cryobuisje of beker (zonder dop) aan de onderste klem van een cryohouder en pompel deze onder in de vloeibare stikstof ter voorbereiding op de opslag van de gevitrificeerde monsters.
- Bepaal het aantal te vitrificeren monsters.
- Plak een sticker met de noodzakelijke informatie op elke steriele petrischaal (of deksel) en het Cryo-opslagmedium.
- Keer elke ampul ES en VS twee keer om zodat de inhoud vóór het gebruik wordt gemengd.
- Prepareer de schaal als volgt met druppeltjes oplossing voor de vitrificatieprocedure:

A. OÖCYT (MI) vitrificatieprotocol:

- OPM.: raadpleeg Deel B voor het embryovitrificatieprotocol.
- Pipetteer op aseptische wijze 20 µl druppel van het kweekmedium, Gewijzigd HTF - HEPES met eiwit, en ES dicht bij elkaar op een omgekeerd deksel van een steriele petrischaal zoals afgebeeld in **figuur 1**, en plaats de schaal onder de microscoop:
 - één 20 µl druppel Gewijzigd HTF (HEPES met eiwit)
 - drie 20 µl druppels (60 µl in totaal) ES (ES1, ES2, ES3)
 - Haal de petrischaal met de MI oöcyten uit de incubator en controleer de kwaliteit van de monsters onder de microscoop. **Kies, indien mogelijk, uitsluitend het (de) MI-fase-oöcyt(en) van de hoogste kwaliteit.**

VOORZICHTIG: beperk de blootstelling van het (de) monster(s) aan licht tijdens equilibratie in de H, ES en VS druppels tot een minimum.

- Breng het oöcyt (maximaal twee tegelijkertijd) met een minimaal volume medium over van de petrischaal (in de incubator) naar de 20 µl druppel H gedurende één minuut.
- Meng de druppel H met ES1 (zie Fig. 1, pijl 1) met de punt van het transferpipet en laat de twee oplossingen spontaan mengen gedurende **2 minuten**.
- Meng dan de druppel ES2 (**pijlte 2**) met de eerder gemengde druppels en laat 2 minuten staan.
- Breng het (de) oöcyten met minimaal oplossingsvolume over van de gemengde druppel naar de ES3-druppel gedurende **6-10 minuten**. **OPm.: de equilibratie van het (de) oöcyt(en) in ES3 is voltooid als de dikte van de zona pellucida en perivitelline ruimte met elkaar overeenkomt. Het (de) oöcyten) zal (zullen) zich binnen 3 minuten ophopen in het onderste gedeelte van de druppel.**
- Tijdens de equilibratietijd in ES3:** Pipetteer op aseptische wijze **één (1) 50 µL druppel VS 2 minuten vóór volledige equilibratie en prepareer de cryotip (afb. 3) of het HSV-rietje (afb. 4) voor het vullen:**
 - CryoTip:** verbinden met de deHamilton-spuit of een ander geschikt zuigapparaatje via een connector of een adapter om te zorgen dat hij goed afgesloten is. **OPMERKING:** Laat het metalen afdekhuysje over de fijne geblazen punt zitten om hem te beschermen tot de monsters erin geplaatst kunnen worden.
 - HSV-buisje:** het langste uiteinde van de blauwe plastic inbrenger verbinden met het gekleurde uiteinde van het geleidingsstaafje.
- De volgende stappen (9-13) dienen binnen 90-110 seconden te worden uitgevoerd. VOORZICHTIG:** blootstelling van monsters aan **VS** dient te worden beperkt om cytotoxiciteit te voorkomen. Het (de) monster(s) hebben de neiging om te drijven in **VS**; pas de focus van de microscoop dus aan voor continue observatie tijdens de blootstelling en houd de punt van het transferpipet bij de hand om een snelle overdracht tussen **VS** druppels te garanderen. Zie Figuur 5.
- Zuig, als equilibratie in ES is bereikt, een kleine hoeveelheid ES op in het transferpipet en breng het (de) monster(s) met minimaal volume uit de druppel ES over naar het **druppel VS gedurende 5 seconden**.

10. Vul en heatseal de CryoTip als volgt (zie figuur 6a):

- Schuiф de metalen beschermhuls omhoog langs de CryoTip zodat het uiteinde van de fijne, breekbare punt bloot komt te liggen.
- Pak de CryoTip en Hamilton-spuit vast, terwijl u deze onder de microscoop observeert, en aspireer voorzichtig een klein volume VS tot markeringnr. 1 op de CryoTip.
- Ga door met de observatie van het monster onder de microscoop en aspireer het monster voorzichtig met VS tot aan markeringnr. 2 op de CryoTip.
- Observeer de CryoTip nu onmiddellijk en aspireer meer VS tot aan markeringnr. 3.
- Het monster moet zich tussen markeringnr. 2 en markeringnr. 3 bevinden.
- Heatseal (sealn. 1) de CryoTip op (of net onder) markeringnr. 1 en schuif de beschermhuls terug omlaag om de fijne breekbare punt af te dekken en te beschermen.
- Haal de CryoTip voorzichtig van het zuiginstrument en de adapter af en heatseal dan bij de markering (**Afsluiting 2**) aan het brede uiteinde van de CryoTip boven de markering **Markering 4**.
- Dompel de bedekte CryoTip direct in de vloeibare stikstof (koelsnelheid -12,000 ° C/min) (zie Figuur 6b).

Vul het HSV-buisje en sluit het als volgt af:

- Plaats het monster/de monsters met behulp van een micropipet voorzichtig in de gleuf van het capillaire staafje op 1 mm van het uiteinde. De druppel die het monster/de monsters bevat moet minder dan 0,5 µl zijn. Maximaal 2 oöcyten of embryo's voor elk capillair staafje.
- Plaats het capillaire staafje en het geleidingsstaafje in het buisje en duw tot het rechthoekige gedeelte van de geleider in contact komt met het ronde uiteinde van het buisje.
- Klem het buisje voorzichtig tussen uw duim en wijsvinger en verwijder de inbrenger.
- Tenwijl u het buisje nog in dezelfde positie houdt, sluit u het open einde af met behulp van een SYMS-afsluter.
- Houd het buisje met behulp van een pinctel vlakbij het geleidingsstaafje.
- Dompel het hele buisje snel verticaal in LN₂ onder. Schud het buisje zachtjes een paar seconden in LN₂ heen en weer om te voorkomen dat zich een isolerende laag van luchtbellen om het buisje vormt.
- Plaats de gevitrificeerde CryoTip of het HSV-buisje in de ondergedompelde, met LN₂ gevulde cryohouder of beker (op het cryostaafje). Sluit de cryohouder (of beker) af of maak hem ondersteboven vast aan een andere onafgesloten cryohouder om de gevitrificeerde CryoTip of het HSV-buisje in vloeibare stikstof te verzekeren.
- Zet de tank met vloeibare stikstof (LN₂) dichtbij de LN₂ cryovriezer en breng de cryohouder met inhoud over naar de cryovriezer voor langdurige opslag.

B. EMBRYO'S (PN tot Blastocyst) vitrificatieprotocol:

- Pipetteer op aseptische wijze één 50 µl druppel ES op een omgekeerd deksel van een petrischaal.
 - Haal de petrischaal met het (de) embryo's uit de incubator en controleer de kwaliteit van het (de) monster(s) onder de microscoop. **Kies, indien mogelijk, uitsluitend het (de) embryo's) van de hoogste kwaliteit voor vitrificatie.**
 - Breng het monster (maximaal twee tegelijkertijd) met een minimaal volume medium over van de petrischaal naar het van een druppel ES en start de timer. Embryo's moeten langzaam equilibreren in de ES druppel middels vrije val gedurende 6-10 minuten. **OPm.: het monster zal krimpen en dan geleidelijk terugkeren naar zijn oorspronkelijke vorm; dit betekent dat de equilibratie voltooid is.**
- VOORZICHTIG: beperk de blootstelling van het (de) monster(s) aan licht tijdens equilibratie in ES en VS druppels tot een minimum.**
- Tijdens deze equilibratietijd in ES:**
 - Plaats (1) 50 µL druppels van de VS-oplossing zoals aangegeven in figuur 7 en maak de CryoTip of het HSV-buisje gereed voor het vullen.**

Volg het protocol zoals hierboven beschreven

(Hoofdstuk A - Oöcyt [MI] vitrificatieprotocol) van stap 8 t/m 16 voor blootstelling aan VS oplossingen, laden van de CryoTip, onderdompelen in vloeibare stikstof (LN₂) en langdurige opslag.

Voor aanvullende informatie over het gebruik van deze producten, dient elk laboratorium haar eigen laboratoriumprocedures en -protocollen te raadplegen die speciaal zijn ontwikkeld en geoptimaliseerd voor uw individueel medisch programma.

BEWAARINSTRUCTIES EN STABILITEIT:

Bewaar de onopengede ampullen gekoeld bij 2 °C tot 8 °C. Als Vitrificatie-invrieskit-oplossingen zoals voorgeschreven worden bewaard, zijn deze stabiel tot aan de uiterste gebruiksdatum die op de sticker van de ampul is vermeld.

Gebruik de media niet langer dan acht (8) weken nadat de verpakking is geopend.

Omdat menselijk bronmateriaal in het product aanwezig is, kunnen zich tijdens de opslag enkele vaste deeltjes ontwikkelen. Van dit soort vaste deeltjes is niet bekend dat ze gevolgen hebben voor de prestatie van het product.

VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Dit hulpmiddel is bedoeld voor gebruik door personeel dat opgeleid is voor procedures inclusief de aangegeven toepassing waarvoor het hulpmiddel is bedoeld.

Als extra voorzorgsmaatregel tijdens de preparatieprocedure raden wij aan elk Cryotip zorgvuldig te onderzoeken nadat het uit de verpakking is gehaald. Vóór het gebruik moeten CryoTips met een geschikte vergroting (40x) worden onderzocht op mogelijke beschadiging (zoals gebroken of gescheurde punt) tijdens het transport.

Gebruik geen ampullen met een oplossing die (vaste) deeltjes bevat of troebel is.

Gebruik aseptische methoden om besmettingsproblemen te vermijden.

Vitrification Freeze Kit oplossingen bevatten het antibioticum gentamicinesulfaat. Passende voorzorgsmaatregelen dienen te worden genomen om ervoor te zorgen dat de patiënt niet gevoelig is voor dit antibioticum.

De onderzoeksliteratuur geeft momenteel aan dat de langetermijneffecten van vitrificatie voor embryo's nog steeds onbekend zijn.

***De voor de vervaardiging van dit product gebruikte menselijke bloedderivaten zijn getest met door de FDA (Amerikaanse Instantie voor Voedsel en Geneesmiddelen) gelicentieerde kits, en verklaard niet-reactief te zijn voor de hepatitis-B oppervlakteantigeen (HBsAg), antilichamen voor hepatitis-C (HCV) en antilichamen voor het menselijk immuundeficiëntievirus (HIV). Geen enkele testmethode kan echter volledige verzekering bieden dat de uit menselijke bronnen verkregen producten niet-infectieus zijn. Alle menselijke bloedderivaten moeten met gebruikmaking van universele voorzorgsmaatregelen worden behandeld alsof zij infecties zouden kunnen overdragen. Donoren van het bronmateriaal zijn ook gescreend op eventuele blootstelling aan de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (CJD).**

Een fles/Flessen waarvan de steriele verpakking beschadigd of op enige wijze in gevaar werd gebracht mag/mogen niet gebruikt worden.

VOORZICHTIG: volgens de Amerikaanse federale wetgeving mag dit product alleen door of op voorschrift van een arts worden verkocht.

ROMÂNĂ

UTILIZARE DESTINATĂ

Vit Kit® - Congelarea este utilizată în tehnicile de reproducere asistată pentru vitrificare și depozitare a ovocitelor umane (MI) și a embrionilor (de la zigot la blastocist). Acest kit este destinat utilizării cu CryoTip® Irvine Scientific (Nr. de catalog 40709) sau Tubul HSV (vitrificare cu grad înalt de siguranță) (Nr. de catalog 019921) și Kitul de decongelare a vitrificării (Vit Kit® - Thaw) pentru recuperarea în condiții optime a probelor.

DESCRIEREA PRODUSULUI

Equilibration Solution-ES este o soluție tamponată HEPES a Mediului -199 conținând sulfat de gentamicină (35 µg/mL), 7.5% (v/v) dimetilsulfoxid (DMSO) glicol de etilenă și 20% (v/v) Dextran Serum Supplement.

Soluția de Vitrificare-VS este o soluție tamponată HEPES a mediului-199, care conține sulfat de gentamicină (35 µg/mL), 15% (v/v) al f iecărui dimetilsulfoxid (DMSO) glicol de etilenă, 20% (v/v) Dextran Serum Supplement și 0.5M zaharoză.

Aceste două soluții vor fi utilizate în succesiune, conform protocolul de vitrificare de decongelare și sortare în trepte a micropicăturiilor

ASIGURAREA CALITĂȚII

Soluțiile din Vit Kit -Freeze au fost filtrate prin membrane și prelucrate aseptice conform procesului de fabricație care asigură un nivel de sterilitate (SAL) de 10⁻³.

Fiecare lot de Vit Kit - Freeze primește următoarele teste:

Soluții și CryoTips

- Endotoxinele prin metodologia de Limulus Amebocyte Lysate (LAL)
- Biocompatibilitatea prin analiza embrionului de șoarece (o celulă)
- Sterilitate determinată prin testare prezentă în Farmacopeea USA <71>

Toate rezultatele sunt raportate la un lot specific într-un Certificat de Analiză care este disponibil la cerere.

MATERIALE NECESARE CARE NU SUNT INCLUSE

- CryoTip® Irvine Scientific (Nr. de catalog 40709) sau Tub HSV (Nr. de catalog 0019921)
- Conector Irvine Scientific (Nr. de catalog 40736) sau alt adaptor
- Cutie Petri Sterilă (50 X 9mm, Falcon 351006 sau echivalent)
- Criotuburi (4.5 ml) sau goblete și criotije
- Mediu de cultură HTF modificat - HEPES suplimentat cu proteină (Nr. de catalog 90126)
- Mânuși disponibile
- Seringă Hamilton GASTIGHT® (50 µL, Nr. de catalog 80901) sau alt instrument de aspirare
- Transferați pipetele (trageți pipetele de sticlă sau micropipetele cu un vârî interior cu diametrul de ~200 µm)
- Pensete
- Emetizare la căldură
- Dispozitiv de etanșare SYMS pentru Tubul HSV (Nr. de catalog 016296)
- Ceas cu cronometru sau Cronometru
- Rezervor cu Azot lichid (container cu volum de 1-2 L prevăzut cu capac Dewar sau Strofoam)
- Azot lichid (volum suficient în rezervor de 4 inch adâncime)

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Kituri de congelare VIT a componentelor (pe aplicație)

- Equilibration Solution (ES):
60 µL pentru **Protocolul de Vitrificare a Oocitelor Sau**
50 µL pentru **Protocolul de Vitrificare a embrionului**.
- Soluție de Vitrificare (VS):
50 µL pentru **Protocolul de Vitrificare**
- 1 CryoTip sau Tubul HSV (**poate depozita două mostre**)
- 1 Conector

PROTOCOL DE VITRIFICARE:

NOTĂ: Procedurile trebuie executate la temperatura camerei (20-27° C). **NU FOLOȘIȚI** măsuta portobiect a microscopului încălzită pentru procedurile următoare. **AVERTISMENT:** Minimalizați expunerea mostrei la lumină în

timpul echilibrării în soluția ES și VS.

- Aduceți cantitatea de soluție de echilibrare (ES) și de soluție de vitrificare (VS) ce urmează a fi utilizată la temperatura camerei (20 - 27 ° C). **NOTĂ:** Evitați aducerea repetată la temperatura camerei a eprubetelor cu ES și VS, atunci când doar o parte din soluție este necesară de fiecare dată. Se recomandă să se ia părți alocate din cantitate în vederea utilizării și să puneți eprubetele din nou la o temperatură de 2 - 8 ° C imediat după luarea părților alocate. Modified HTF (HEPES) cu proteine este de asemenea cerut la protocolul de vitrificare a ovocitelor.
- Umpleți rezervorul cu lichid de azot (suficient să ajungeți la o adâncime de 4 inci sau ca să scufundați complet criotubul pe tijă) și puneți aproape de microscop. Așași criotubul sau gobletul (neacoperit) la capătul de jos a cleștei criotije și scufundați în azotul lichid din containerul utilizat în prepararea pentru depozitarea mostrelor vitrificate.
- Determinați numărul de mostre care trebuie să fie vitrificate.
- Puneți etichete cu informații necesare pe fiecare cutie Petri sterilă (sau capac) și pe dispozitivul de păstrare Cryo.
- Înainte de utilizare, învârtiți cu grijă și amestecați de două ori conținutul din fiolele de ES și VS
- Preparați vasul cu picături de soluție pentru Procedura de Vitrificare după cum urmează:

A. OVOCITE (MI) Protocol de Vitrificare:

NOTĂ: Vezi Capitolul B → protocolul privind vitrificarea embrionului.

- Distribuiți în condiții aseptice 20 µL picătură de mediu de cultură HTF modificat - HEPES cu proteină și ES în imediata apropiere pe un capac întors al unei cutii Petri sterile, după cum este indicat în Figura 1 și puneți cutia pe platina microscopului:
 - O picătură de 20 µL de HTF modificat (HEPES cu proteină)
 - Trei picături -20 µL (60 µL total) de ES (ES1, ES2, ES3)
- Scoteați cutia de cultură conținând ovocitele MI din incubator și verificați calitatea mostrelor sub microscop. **Dacă este posibil, selectați numai ovocitele de cea mai bună calitate, stadiu MI.** **AVERTISMENT:** Minimalizați expunerea mostrei(lor) la lumină în timpul echilibrării efectuate în picăturile de H, ES și VS.
- Transferați ovocitele (până la 2 în același timp) cu un volum minim de mediu de cultură (în incubator) într-o picătură de 20 µL de H pentru un minut.
- Amestecați picăturile H cu ES1 (vezi Fig.1,săgeta 1) cu vârful pipetei de transfer până se omogenizează cele două soluții, timp de **2 minute**.
- Apoi amestecați picătura de ES2 (săgeta 2) cu picăturile amestecate anterior și lăsați timp **de 2 minute**.
- Transferați ovocitul (ovocitele) cu un volum minim de soluție din picătura amestecată în picătura de soluție de echilibrare ES3 timp de **6-10 minute**. **Notă:** Echilibrarea ovocitului(lor) în ES3 este completă când grosimea zonei pellicula devine egală cu cea a spațiului perivitelin. **Ovocitul(ele) se va așeza la fundul picături în 3 minute.**
- Timpul cât durează echilibrarea în ES3: Repartizați aseptice o (1) picătură de soluție de vitrificare VS de 50 µL cu 2 minute înainte de încheierea echilibrării și pregătiți cryotipul (fig. 3) sau paleta HSV (fig. 4) pentru încărcare:**
 - CryoTip:** conectarea la seringă Hamilton sau la instrumentul de aspirare corespunzător cu ajutorul unui conector sau unui adaptor pentru a asigura o etanșare perfectă. **NOTĂ:** Mențineți manșonul capacului metalic peste vârful fin tras pentru a-l proteja până când acesta este pregătit pentru încărcarea probei.
 - Tubul HSV:** conectarea capătului lui al dispozitivului de inserție din plastic de culoare albastră la capătul colorat al tijei de transfer.

- Următoarele trepte (9-13) vor fi efectuate în 90-110 secunde. AVERTISMENT:** Expunerea mostrei la VS trebuie limitată pentru a preveni citotoxicitatea acestuia. **Mostra(rele)** tinde să înoate în VS, deci ajustați focalizarea microscopului pentru a menține o vizualizare continuă în timpul expunerii și țineți vârful pipetei de transfer în apropiere pentru a asigura transferul rapid între picăturile VS. **Vezi Figura 5.**

- După ce ați terminat echilibrarea în ES, trageți în pipeta de transfer puțin ES și transferați mostra(ele) cu un volum minim de ES în **picături de VS pentru 30 secunde**.
- Încărcați și etanșați la cald CryoTip-ul, după cum urmează (A se vedea Figura 6a):**
 - Glașați manșonul metalic în sus de-a lungul CryoTip-ului pentru a expune vârful fin și fragil.
 - Manipulați CryoTip și seringă Hamilton în timp ce observați sub microscop, aspirați cu grijă un volum mic de VS până la **semnul #1** de pe CryoTip.
 - Continuați observarea sub microscop și aspirați cu grijă mostra cu VS până la **semnul #2** de pe CryoTip.
 - Acum puteți observa direct CryoTip-ul și aspirați mai mult VS până la **semnul #3**.
 - Mostra trebuie pusă între **semnele #2 și #3**.
 - Lipiti la căldură (**sigliul #1 și #1a**) CryoTip-ul pe (sau numai sub) **semnul #1** și glașați manșonul înapoi, în jos pentru a acoperi și proteja vârful fragil fin.
 - Scoteați cu grijă CryoTip-ul din instrumentul de aspirare și din adaptor și apoi etanșați la cald (**Sigiliul nr. 2**) de la capătul gros al CryoTip-ului deasupra **Semnului nr. 4**.
 - Împingeți CryoTip acoperit direct în azotul lichid (răcind la o rată de 12,000°C/minute) (Vezi Figura 6b).

Încărcați și etanșați tubul HSV după cum urmează:

- Cu o micropipetă, transferați cu atenție proba (probele) în canalul tijei capilare la 1 mm de capăt. Picătura care include proba (probele) trebuie să fie sub 0,5 µl. Maxim 2 ovocite sau embrioni pentru fiecare tijă capilară.
- Plasați imediat tijă capilară și manipulatorul în tub și apăsați până ce porțiunea dreptunghiulară a manipulatorului intră în contact cu capătul conic al tubului.
- Strângeți ușor tubul între degetul mare și degetul arător și îndepărtați dispozitivul de inserție.
- În timp ce continuați să țineți tubul nemiscat, etanșați capătul deschis cu dispozitivul de etanșare SYMS.
- Țineți tubul cu o pensetă în zona tijei de transfer.
- Scufundați rapid tubul întreg în azot lichid (LN₂) în poziție verticală. Agitați ușor tubul în azot lichid (LN₂) timp de câteva secunde pentru a evita formarea unui strat de bule de aer izolat în jurul tubului.
- Plasați CryoTip-ul vitrificat sau tubul HSV în tubul de criogenare sau gobletul umplut și scufundați în azot lichid (LN₂) (pe CryoCane). Acoperiți tubul de criogenare (sau gobletul) cu un capac sau conectați-l în poziție răsturnată cu un alt tub de criogenare fără capac pentru a fixa CryoTip-ul vitrificat sau tubul HSV în nitrogen lichid.
- Mutați rezervorul cu azotul lichid (N₂) în crio congelator N₂ și transferați criotija cu conținutul în crio congelator pentru depozitare de lungă durată.

B. Protocol de Vitrificare pentru EMBRIONII (PN Blastocite)

- Distribuiți aseptice o picătură de 50 µL de ES pe capacul răsturnat al unei cutii Petri.
- Scoteați cutia de cultură conținând embrionul (ii) din incubator și verificați calitatea mostrei (lor) sub microscop. **Dacă este posibil, selectați numai embrioni de cea mai bună calitate pentru vitrificare.**
- Transferați cu grijă mostra (până la 2 în același timp) cu un volum minim din mediul de cultură până la Suprafața picături de ES și pomiiți cronometrul. Embrionii trebuie echilbrați înot în picăturile ES prin cădere liberă timp de 6-10 minute.

Notă: **Mostrele se vor micșora în diametru iar după aceea vor reveni treptat la mărimea originală, ceea ce indică că echilibrarea a fost realizată cu succes.**

AVERTISMENT: Minimalizați expunerea mostrei (lor) la lumină în timpul echilibrării efectuate în picăturile de ES și VS.

- În timpul acestei echilibrări de timp în ES:
 - pregătiți (1) 50 µL picături de soluție de vitrificare (VS) așa cum este indicat în Figura 7 și pregătiți CryoTip-ul sau tubul HSV pentru încărcare.

Urmați protocolul cu este scris deasupra (Secțiunea A - MII Protocol de Vitrificare a

ovocitelor) de la treapta 8 până la 16 privind expunerea soluției VS, **încărcați CryoTip-ul ,scufundați-l în azotul lichid N₂ și depozitați** pe timp îndelungat.

Pentru detalii suplimentare privind folosirea acestui produs, fiecare laborator trebuie să consulte protocolul pentru procedurile utilizate în laborator care sunt specifice și optimizate pentru programul medical individual.

INSTRUCȚIUNI DE PĂSTRARE ȘI VALABILITATE:

Păstrați fiolele nedeschise refrigerate la o temperatură între 2°C și 8°C. Păstrare conform instrucțiunilor, soluțiile kitului de congelare prin vitrificare rămân stabile până la data expirării înscrisă pe eticheta fiole.

După deschiderea containerelor, durata de utilizare a mediilor nu trebuie trebuie să depășească opt (8) săptămâni.

Întrucât în produs este prezent material de natură umană, acesta ar putea genera o oarecare cantitate de particule în suspensie pe durata păstrării. Nu este cunoscut ca acest tip de particule în suspensie să aibă vreun efect asupra performanței produsului.

PRECAUȚII ȘI AVERTISMENTE

Acest dispozitiv este destinat să fie utilizat de personalul specializat în proceduri care includ aplicarea indicată pentru care a fost creat dispozitivul.

Vă recomandăm ca și o precauție adăugată să examinați cu atenție fiecare produs Cryotip scos din pachet înainte de începerea procedurilor de preparare. Înainte de utilizare CryoTips-ul trebuie să fie examinat prin mărire potrivită (de 40X) pentru a depista eventualele deteriorări care pot apare în timpul transportului (de exemplu vârful spart sau crăpat).

Nu utilizați sticlule sau fiole cu mediu care prezintă reziduuri de particule sau sunt încețoșate.

Pentru a evita probleme de contaminare, mânuiți folosind tehnici aseptice.

Soluția Vitrificarea Freeze Kit conține sulfat de gentamicină ca și antibiotic. Precauții apropiate trebuie luate pentru a asigura că pacientul nu este alergic la acest antibiotic.

În prezent literatura de specialitate nu indică efecte de lungă durată a procesului de vitrificare pe embrioni.

***Derivatele din sânge uman care au fost utilizate la fabricarea acestui produs au fost testate cu ajutorul unor truse aprobate de FDA și au fost găsite ca fiind ne-reactive la antigenul de suprafață al virusului hepatiei B (AgHBs), anticorpilor împotriva virusului hepatitei C (VHC) și anticorpilor împotriva virusului imunodeficienței umane (VIH). Cu toate acestea, nicio metodă de testare nu oferă garanții complete că produsele derivate din surse umane sunt neinfecțioase. Manipularea tuturor derivatelor de sânge uman trebuie să se facă ca și cum acestea sunt purtătoare de agenți infecțioși, folosind măsuri universale de precauție. Donorii materialului-sursă au fost, la rândul lor, testați din punct de vedere al riscului de expunere la boala Cretzfeldt-Jakob (BCJ).**

Nu utilizați niciun flacon al cărui ambalaj steril a fost compromis.

AVERTISMENT: Legile Federale în (SUA) nu permit vânzarea acestui aparat numai la comanda unui medic sau pe bază de comandă.

AVSEDD ANVÄNDNING

Vit Kit® - Freeze är avsedd för användning vid procedurer för assisterad reproduktion, för vitrifiering och förvaring av humana oocyter (MI) och embryon (zygot till blastocyst). Detta kit är avsett att användas tillsammans med Irvine Scientifics CryoTip® (Katalognr 40709) eller HSV-strån (Katalognr 019921) och Vitrifieringsupptynings-kit (Vit Kit® - Thaw) för optimalt återställande av prover.

PRODUKTBESKRIVNING

Equilibrage Solution-ES är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 innehållande gentamicinsulfat (35 µg/mL), 7,5 % (v/v) av vardera dimetylsulfoxid (DMSO) och etylenglykol samt 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement.

Vitrifieringslösning-VS är en HEPES-buffrad lösning av Medium-199 innehållande gentamicinsulfat (35 µg/mL), 15 % (v/v) av vardera dimetylsulfoxid (DMSO) och etylenglykol samt 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement samt 0,5 M sukros.

Dessa två lösningar skall användas i sekvens enligt det stegvisa mikrodrophe-vitrifieringsprotokollet.

KVALITETSSÄKRING

Lösningarna i Vit Kit-Freeze är membranfiltrerade och aseptiskt behandlade enligt tillverkningsförfaranden som har validerats för att uppfylla en sterilitetsnivå (SAL, Sterility Assurance Level) på 10⁻³.

Varje lot Vit Kit - Freeze genomgår följande tester:

Lösningar och CryoTips.

Endotoxin via LAL-metod (Limulus Amebocyte Lysate)

Biokompatibilitet enligt analys av musembryon

(en cell)

Sterilitet enligt aktuell USP-test för sterilitet <71>

(United States Pharmacopeia)

Alla resultat finns rapporterade på ett lotspecifikt analyscertifikat (Certificate of Analysis) som fås på begäran.

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Irvine Scientific CryoTip® (Katalognr 40709) eller HSV-strån (Katalognr 0019921)
- Irvines Scientific-anslutning (Katalognr 40736) eller annan adapter
- Sterila petriskålar (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller motsvarande)
- Kryrorör (4,5 mL) eller rundbottnade rör utan lock samt kryrorörhållare
- Modifierad HTF - HEPES (Katalognr 90126) odlingsmedium med tillsats av protein
- Engångshandskar
- Hamilton GASTIGHT®-spruta (50 µl, Katalognr 80901) eller annat verktyg för aspiration
- Överföringspipetter (glaspipetter med tunn spets eller mikropipettspetsar med en inre spetsdiameter på cirka 200 µm)
- Pincett
- Impulse Heat Sealer
- SYMS-förseglare för HSV-strån (Katalognr 016296)
- Stoppur eller tidtagare
- Behållare med flytande kväve (Dewar- eller Styrofoam-behållare med lock, volym 1-2 L)
- Flytande kväve (tillräcklig volym för att erhalla ett djup på 10 cm i behållaren)

BRUKSANVISNING

Vit Kit Freeze komponenter som krävs (per applikation):

- Equilibration Solution (ES):
60 µL för **vitrifieringsprotokoll för oocyt**
Eller
50 µL för **vitrifieringsprotokoll för embry**
o
- Vitrifieringslösning (VS):
50 µL för **vitrifieringsprotokoll**
1 CryoTip eller HSV-strån (**för lagring av högst 2 preparat**)
- 1 Koppling

VITRIFIERINGSPROTOKOLL:

OBS! Dessa procedurer skall utföras vid

rumstemperatur (20-27 °C). OBS! Minimera exponering av preparaten för ljus under ekvillibrering i ES- och VS-lösningarna.

- Låt den mängd jämviktslösning (ES) och vitrifieringslösning (VS) som ska användas anta rumstemperatur (20-27 °C) innan de vitrifierade proverna tinas upp. OBS: Undvik att låta hela ampuller med ES och VS bli rumstempererade uppregade gånger när endast en del av lösningen behövs åt gången. Det är bättre att hålla av den mängd som ska användas och sedan genast sätta tillbaka ampullerna till kylförvaring vid 2-8 °C. Modified HTF (HEPES) med protein krävs också för vitrifieringsprotokollet för oocyter.
- Fyll behållaren för flytande kväve med flytande kväve (till ett djup på 10 cm eller så att kryroröret på hållaren är helt nedsänkt) och placera den intill mikroskopet. Placera ett kryrorör eller ett rundbottnat rör (utan lock) på den nedersta klämman på en kryrorörhållare och sänk ned hållaren i flytande kväve inför förvaring av de vitrifierade preparaten.
- Bestäm hur många preparat som skall vitrifieras.
- Märk varje steril petriskål (eller lock) och kryolagringsenhet med nödvändig information.
- Vänd försiktigt varje ampull ES och VS två gånger så att innehållet blandas före användning.
- Preparera skålen med droppar av lösning för vitrifieringsförfarandet på följande sätt:

A. Vitrifieringsprotokoll för OOCYT (MI):

OBS! Se avsnitt B för vitrifieringsprotokoll för embry.

- Dispensera aseptiskt 20 µL droppar odlingsmedium, modifierad HTF - HEPES med protein och ES aldeels intill på ett upp-och-nedvänt lock till en steril Petriskål så som visas i figur 1 och placera skålen på mikroskopets objektbord:
 - en 20 µL droppa modifierad HTF (HEPES med protein)
 - tre 20 µL-droppar (sammanlagt 60 µL) ES (ES1, ES2, ES3)
- Ta ut odlingskålen med MI-oocyter från inkubatorn och kontrollera preparatens kvalitet under mikroskop. **Välj endast stadie MI-oocyt(er) av bästa kvalitet, när så är möjligt.**
OBS! Minimera exponering av preparatet(n) för ljus under ekvillibrering i H-, ES- och VS-dropparna.
- Flytta över oocyten (högst två i taget) med en minimal volym medium från odlingskålen (i inkubator) till 20 µL H-droppen i en minut.
- Sammanför H-droppen med ES1 (se fig. 1, pil 1) med spetsen på överföringspipetten och låt de två lösningarna blandas spontant i **2 minuter**.
- Låt sedan ES2-droppen (pil 2) blanda sig med de redan blandade dropparna och låt stå **2 minuter**.
- Flytta över oocyten(-erna) med minimal volym lösning från den sammanförda droppen till ES3-droppen i **6-10 minuter**. **Obs! Ekvillibreringen av oocyt(er) i ES3 är fullbordad när zona pellucida och det perivitellina spatiat har samma tjocklek.** Oocyt(en)oocyterna sjunker till botten av droppen inom 3 minuter.
- Under ekvillibreringsperioden i ES3:**
Dispensera aseptiskt en (1) 50 µL-droppa VS 2 minuter före fullständig ekvillibrering och förbered cryotip (fig 3) eller HSV-strået (fig 4) för laddning:
 - CryoTip:** koppla till Hamilton-sprutan eller annat lämpligt aspirationsverktyg med hjälp av en koppling eller adapter för att tillförsäkra tät förslutning. OBS: Låt metallhysan sitta kvar över den tunna spetsen så att den skyddas tills det är dags att dispensera proverna.
 - HSV-strå:** koppla den långa delen av den blå införingsenheten till den färgade änden av hanteringsstaven.
- Följande steg (9-13) bör utföras inom 90-110 sekunder. OBS! För att förhindra cytotoxicitet skall exponering av preparaten för VS begränsas. Preparat tenderar att flyta i VS, så justera mikroskopets fokus så att kontinuerlig visualisering bibehålls under exponeringen, och ha överföringspipettens spets i närheten så att snabb överflyttning mellan VS-

dropparna säkerställs. Se figur 5.

- Efter avslutad ekvillibrering i ES, dra upp litet ES i överföringspipetten och flytta över preparatet(n) från ES-droppen, med minimal volym, till **droppen VS i 30 sekunder**.
- Ladda och värmeförsegla CryoTip enligt följande (se figur 6a):**
 - Skjut upp skyddshysan av metall längs CryoTip så att den tunna, sköra spetsändan exponeras.
 - Hantera CryoTip och Hamilton-sprutan medan du observerar i mikroskopet och aspirera försiktigt en liten volym VS till **märke nr 1** på CryoTip.
 - Fortsätt att observera under mikroskop och sug försiktigt upp preparatet med VS till **märke nr 2** på CryoTip.
 - Observera nu CryoTip direkt och aspirera mer VS till **märke nr 3**.
 - Preparaten måste finnas mellan **märke 2** och **märke 3**.
 - Värmeförsegla (**försöglning nr 1**) CryoTip vid (eller strax nedanför) **märke nr 1** och skjut sedan skyddshysan tillbaka ned så att den tunna och sköra spetsen skyddas.
 - Avlägsna försiktigt CryoTip från aspirationsverktyget och adaptern och värmeförsegla sedan (försöglning nr 2) vid den fjocka änden av CryoTip över märke nr 4.
 - Sänk ned den täckta CryoTip direkt i flytande kväve (nedkylning vid en hastighet av -12 000 °C/min) (se figur 6b).

Ladda och försegla HSV-strået enligt följande:

- Placera försiktigt provet/proverna med hjälp av en mikropipett i kapilläröret i rännan 1 mm från änden. Provdroppen måste vara under 0,5 µL. Maximalt 2 oocyter eller embryon till varje kapillärör.
 - Placera genast kapilläröret och hanteringsstaven i strået och tryck på tills den rektangulära delen av handtaget kommer i kontakt med den vidgade änden av strået.
 - Fatta försiktigt tag i strået med tummen och pekfingeret och tag bort införingsenheten.
 - Medan strået fortfarande hålls på plats, försegla den öppna änden med hjälp av SYMS-försegling.
 - Håll strået med pincett nära hanteringsstaven.
 - Låt hela strået snabbt falla ner i LN₂ vertikalt. Rör försiktigt om strået i LN₂ några sekunder för att undvika att det bildas ett isolerande lager med luftbubblor runt det.
- Placera den vitrifierade CryoTip eller HSV-strået i det nedsänkta LN₂-fyllda kryroröret eller bägaren (på kryosticken). Stäng kryroröret (eller bägaren) eller sätt ihop det upp-och-ned med ett annat öppet kryrorör för att säkra att det vitrifierade CryoTip eller HSV-strået ligger i flytande kväve.
 - Flytta behållaren med flytande kväve (LN₂) intill LN₂-frysens och överför kryrorörhållaren med innehåll till frysen för långtidsförvaring.

B. Vitrifieringsprotokoll för EMBRYON

(PN till blastocyst):

- Dispensera aseptiskt en 50 µL droppa ES på ett uppenbart lock från en petriskål.
- Ta ut odlingskålen med embryot(n) från inkubatorn och kontrollera preparatets(-ens) kvalitet under mikroskop. **Välj endast embryon(n) av bästa kvalitet för vitrifiering, när så är möjligt.**
- För omsorgsfullt över preparatet (högst två i taget) med en minimal volym medium från odlingskålen till ES-droppen och starta tidtagaren. Embryona bör ekvibrera långsamt i ES-droppen genom fritt fall i 6-10 minuter.
Obs! Preparatet kommer att krympa och därefter successivt återgå till sin ursprungliga storlek, vilket anger att ekvillibreringen är fullbordad.
OBS! Minimera exponering av preparatet(n) för ljus under ekvillibrering i ES- och VS-dropparna.
- Under denna ekvillibreringsperiod i ES:
 - placera (1) 50 µL droppar VS-lösning enligt figur 7 och förbered CryoTip eller HSV-strået för laddning.

Följ ovanstående protokoll (avsnitt A - Vitrifieringsprotokoll för oocyt [MI]) från steg 8 t.o.m. 16 för exponering för VS-lösningar, laddning av CryoTip, nedsänkning i flytande kväve (LN₂) samt långtidsförvaring.

För ytterligare information om användning av dessa produkter bör varje laboratorium konsultera sina egna laborieförfaranden och -protokoll som utvecklats och optimerats särskilt för de egna medicinska programmen.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET:

Öppnade ampuller ska förvaras i kylskåp vid 2-8 °C. Vid förvaring enligt anvisningarna är lösningarna i satsen för vitrifiering och nedfrysning hållbara fram till det utgångsdatum som anges på ampulletiketterna.

Medierna får inte användas under längre tid än åtta (8) veckor efter att behållarna har öppnats.

Eftersom produkten innehåller material av humant ursprung kan partiklar bildas under förvaring. Denna typ av partiklar har inte visats utöva någon effekt på produktens funktion.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

Denna produkt är avsedd att användas av personal med utbildning i procedurer vilka inkluderar den indicerade tillämpning för vilken produkten är avsedd.

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

Använd inga ampuller med lösning som innehåller partiklar eller är grumliga.

Använd aseptisk teknik vid hantering, så att kontamination undviks.

Vitrification Freeze Kit-lösningarna innehåller antibiotik gentamicinsulfat. Adekvata försiktighetsåtgärder skall vidtas för att säkerställa att patienten inte är allergisk mot detta antibiotikum.

Forskningslitteraturen anger att de långsiktiga effekterna på embryon av vitrifiering för närvarande är ökända.

***Humana blodderivat som används i framställningen av denna produkt har testats med FDA-godkänd testutrustning och befunnits vara icke-reaktiva med avseende på hepatit B yntagen (HBsAg), antikroppar mot hepatit C (HCV) och antikroppar mot humant immunbristvirus (HIV). Det finns emellertid ingen testmetod som fullständigt kan garantera att produkter som utvunnits ur humana källor är icke-smittsamma. Hantera alltid humana blodderivat som om de skulle kunna överföra smitta, med användande av allmänt vedertagna försiktighetsåtgärder. Källmaterialets donatorer har också screenats med avseende på risk för exponering för Creutzfeldt-Jakobs sjukdom (CJD).**

Använd aldrig en flaska vars sterila förpackning inte är helt intakt.

OBS! Enligt federal (USA) lag får denna produkt endast säljas av eller på ordination av läkare.

TÜRK

KULLANIM AMACI

Vit Kit ® - Freeze insan oositlerinin (MII) ve embriyolarının (zigottan blastokiste) vitrifikasyonu ve depolanmasına yönelik yardımla üreme prosedürlerinde kullanılır. Bu kit, ömeklerin optimal geri kazanımı için Irvine Scientific CryoTip® (Katalog No. 40709) veya HSV Payet (Katalog No. 019921) ve Vitrifikasyon Eritleme Kiti (Vit Kit ® - Thaw) ile kullanımı için tasarlanmıştır.

ÜRÜN TANIMI

Dengeleme Solüsyonu-ES, HEPES tamponlu bir Medyum-199 solüsyonudur ve gentamisin sülfat (35 µg/mL), %15 (v/v) DMSO ve etilen glikol ve %20 (v/v) Dekstran Serum Takviyesi içerir.

Vitrifikasyon Solüsyonu-VS, HEPES tamponlu bir Medyum-199 solüsyonudur ve gentamisin sülfat (35 µg/mL), %15 (v/v) DMSO ve etilen glikol, %20 (v/v) Dekstran Serum Takviyesi ve 0.5 M sükröz içerir. Bu kit solüsyon, adımı mikro-damla vitrifikasyon protokolüne göre sırayla kullanılmalıdır.

KALİTE GÜVENCESİ

Vit Kit-Freeze'deki solüsyonlar membran filtrelerdir ve 10-3'lük sterilite güvence düzeyini karşıladığı doğrulanmış üretim prosedürlerine göre aseptik olarak işlenmiştir.

Vit Kit-Freeze partilerinden her biri şunlar için test edilmiştir:

Endotoksin (Limulus Amebosit Lizat Testi ile)
Biyouyumluluk (Tek Hücreli Fare Embriyo Testi ile)
Sterilite (güncel USP Testi ile <71>)

Tüm sonuçlar, talep üzerine sunulacak olan parti-spesifik bir Analiz Sertifikası'nda raporlanmaktadır.

GEREKLİ OLAN AMA TEDARİK EDİLMEYEN MATERYALLER

- Irvine Scientific CryoTip® (Katalog No. 40709) veya HSV Payet (Katalog No. 0019921)
- Irvine Scientific Connector (Katalog No. 40736) veya başka adaptör
- Steril Petri Tabaklar (50 X 9 mm, Falcon 351006 veya muadil ürün)
- Kriyo tüpler (4.5 mL) veya gobletler ve kriyo-çubuklar (cryocanes)
- Protein takviyeli Modifiye HTF - HEPES (Katalog #90126) kültür medyum
- Tek kullanımlık eldiven
- Hamilton GASTIGHT® Şırınga (50 µL, Katalog #80901) veya bir başka aspirasyon aracı
- Transfer pipetleri (çekmeli cam pipetler veya ~200µm iç uç çaplı mikropipet uçları)
- Cimbız
- İmpulse Sıcak Mühür Aracı
- HSV Payeti için SYMS Yalıtıcı (Katalog No. 016296)
- Kronometre veya timer
- Sıvı Nitrojen Rezervuarı (kapaklı, 1-2L hacimli termos veya strafor kap)
- Sıvı Nitrojen (rezervuarda 4 inç derinlik oluşturmaya yetecek miktarda)

KULLANIM YÖNERGELERİ

Vit Kit-Freeze bileşen gereksinimleri (her bir uygulama için):
• Dengeleme Solüsyonu-ES:

Oosit Vitrifikasyon Protokolü için 60 µL

Veya

Embriyo Vitrifikasyon Protokolü için 50 µL

• Vitrifikasyon Solüsyonu-VS:

Vitrifikasyon Protokolü için 50 µL

- 1 Kriyo Ucu veya HSV Payeti (**2 örnek kapasiteli**)
- 1 Konnektör

VİTRİFİKASYON PROTOKOLÜ:

NOT: Prosedürlerin oda sıcaklığında (20-27°C) uygulanması gerekmektedir. Aşağıdaki prosedürler için ısıtılmış mikroskop tablası kullanmayın. DİKKAT: ES ve VS solüsyonlarında dengeleme sırasında örneğin ısığa maruziyetini minimize edin.

- Kullanılacak ES ve VS miktarını oda sıcaklığına getirin (20-27°C). NOT: Solüsyonun bir parçasının gerektiği her durumda ES ve VS yalıllarını bütün olarak oda sıcaklığına getirmekten sakının. Kullanılacak miktarı alkottlamak ve alkottlamadan hemen sonra yalılları 2-8°C'a geri koymak daha iyidir.

- Proteinli Modifiye HTF (HEPES) de oosit vitrifikasyon protokolü için gereklidir.
- Sıvı nitrojen rezervuarını sıvı nitrojenle doldurun (4 inç derinlik elde edecek veya kriyo tüpü çubuğa tamamen batırarak kadar) ve mikroskoba yakın bir şekilde yerleştirin. Bir kriyo çubuğun altı kılampına bir kriyo tüp veya goblet (kapaksız) ilişkin ve vitrifiye ömeklerin saklanmasına hazırlık olarak sıvı nitrojenle batırın.
- Vitrifiye edilecek ömeklerin sayısını belirleyin.
- Her steril petri tabağı (veya kapak) ve Kriyo saklama cihazını gerekli bilgiyle etiketleyin.
- Kullanım öncesinde içikleri karıştırmak için her bir ES ve VS yalılları için kez nazikçe ters çevirin.
- Tabağı solüsyon damlacıklarıyla vitrifikasyona hazırlayın.

İzlenecek prosedür:

A. OOSİT (MII) Vitrifikasyon Protokolü:

NOT: Embriyo vitrifikasyon protokolü için Bölüm B'ye bakın.

- Aseptik bir şekilde kültür medyumundan, proteinli Modifiye HTF-HEPES'ten ve ES'ten 20 µL'lık damlaları Şekil 1'de gösterildiği gibi steril petri tabağının ters çevrilmiş kapakı üzerinde birbirine yakın bir şekilde koyun ve tabağı mikroskop tablasına yerleştirin:
 - bir tane 20 µL Modifiye HTF (proteinli HEPES) damlası
 - üç tane 20 µL (toplam 60 µL) ES (ES1, ES2, ES3) damlası
- MIİ oositlerini içeren kültür tabağını inkübatörden çıkarın ve mikroskop altında örneklirin kalitesini kontrol edin. **Mümkün olduğu durumlarda yalnızca en iyi kalite MIİ evresi oosit(ler) ini seçin. DİKKAT: H, ES ve VS damlalarından dengeleme sırasında örneklerin ısığa maruziyetini minimize edin.**
- Minimal medyum hacmiyle oosit (bir kereden en fazla 2 tane) kriyo tabağından (inkübatörde) alıp bir dakika için 20 µL'lık bir H damlasına aktarın.
- H damlasını transfer pipetinin ucunu kullanarak ES1'e birleştirin (Bkz. Şekil 1, ok 1) ve 2 dakika boyunca içi solüsyon spontan karışmaya bırakın.
- Sonra ES2 damlasını (ok 2) daha önce birleştirilen damlalarla birleştirin ve 2 dakika bırakın.
- Oosit/oositleri birleştirilmiş damladan ES3 damlasına minimum solüsyon hacmiyle **6-10 dakikalığına** aktarın. **Not: Zona pellucida ve perivitellin alanının kalınlığı eşit olduğunda, ES3'teki oositlerin dengelenmesi tamamlanmıştır. Oositler 3 dakika içinde damlamanın dibine oturacaktır.**
- ES3 içindeki dengelenme süreci iktadır: **Dengeleme tamamlanmadan 2 dakika önce aseptik olarak (1) 50 µL VS 2 damlasını koyun ve CryoTip (şekil 3) veya HSV payeti (şekil 4) kısmını yüklemeye için hazırlayın:**
 - **Kriyo Ucu:** Sıkı yalıtım sağlamak için bir konnektör veya adaptör kullanarak Hamilton şırıngasına veya uygun aspirasyon aracına bağlayış. NOT: Metal kapak manşonunu ince çekmeli ucun üzerinde tutarak numuneleri yüklemeye hazır oluncaya kadar koruyun.
 - **HSV Payet:** Mavi plastik insersiyon cihazının uzun ucunu, kavrama kolunun renkli ucuna bağlayış.
- Aşağıdaki adımlar (9-13) 90-110 saniye arasında tamamlanmalıdır DİKKAT: Sitotoksisiteyi önlemek için, örneklerin VS'ye maruziyeti sınırlanmalıdır. Örnekler VS'te yüzmeye eğilimindedir, dolayısıyla ışıklaa sırasında sürekli görüntülemeyi sürdürmek için mikroskoptan odağı ayarlayın ve VS damlalarının hızlı transferini sağlamak için transfer pipetinin ucunu yakında tutun. Bkz. Şekil5.**
- ES'de dengeleme tamamlandıktan sonra bir miktar ES'yi transfer pipetine çekerek 30 saniye boyunca ömekleri minimal hacimle ES damlasından VS'nin ilk damlasının merkezine aktarın.
- Kriyo Ucu aşağıdaki gibi (Bkz. Şekil 6a) yükleyin ve sıcak mühür basın:**
 - Ince ucu açığa çıkarmak için metal kapak manşonu Kriyo Ucu boyunca kaydırın.
 - Mikroskop altında inceleme sırasında Kriyo Ucu ve Hamilton şırıngasını tutarak, VS'nin küçük bir hacmini Kriyo Ucu üzerinde dikkatli bir şekilde işaret #1'e aktarın.

- Mikroskop altında gözlemlemeye devam edin ve VS'li ömeği Kriyo Ucu üzerinde nazikçe işaret #2'ye aktarın.
- Sımdı doğrudan Kriyo Ucu gözlemleyin ve işaret #3'e daha fazla VS aktarın.
- Örnek işaret #2 ile işaret #3 arasında bulunmalıdır.
- Kriyo Ucu işaret #1 üzerinde (veya hemen altında) sıcak mühür basın (Mühür #1) ve ince ucu kapatmak ve korumak için kapak manşonunu geri kaydırın.
- Kriyo Ucu aspirasyon aracından ve adaptörden dikkatli bir şekilde çıkarın ve işaret #4'un üzerinde Kriyo Ucu kalın ucundan sıcak mühür basın (Mühür #2).
- Kapatılmış Kriyo Ucu doğrudan sıvı nitrojenle batırın (~12,000°C/dakika hızla soğuma) (Bkz. Şekil 6b).

Aşağıda belirtilen şekilde HSV payetini yükleyin ve yalıtın:

- Bir mikropipet kullanarak ömekleri dikkatli bir şekilde ucu 1 mm mesafede kapiler tüpün oluğuna yığın. Ömekleri içeren damla 0.5 µL'nin altında olmalıdır. her bir kapiler tüp için en fazla 2 oosit veya embriyo olmalıdır.
- Kapiler tüpü ve kavramayı hemen payetin içine yerleştirin ve kavramanın dikködrden kısmı payetin konik ucuna temas edene kadar itin.
- Payeti baskırmamağınızla işaret parmağınız arasında hafifçe sıkıştırın ve insersiyon cihazını çıkarın.
- Payeti yerinde tutmaya devam ederken bir YSMS yalıtıcı kullanarak açık ucu yalıtın.
- Cimbız kullanarak payeti kavrama çubuğu alanında tutun.
- Tüm payeti hızla dikey olarak LN2'ye batırın. Birkaç saniye boyunca payeti LN2 içinde sallayarak payet etrafında izole edici bir hava kabarcığı katmanının oluşmasını önleyin.
- Vitrifiye Kriyo Ucu veya HSV payeti LN2'ye batırılmış kriyo tüpün veya gobletin (kriyo çubukta) içine yerleştirin. Vitrifiye Kriyo Ucu veya HSV payeti sıvı nitrojenle tutmak için kriyo tüpü (veya gobleti) tıpalayın veya bir başka tıpasız kriyo tüpü birlikte ters ilişkin.
- LN2 rezervuarını LN2 kriyo dondurucusuna yaklaştırsın ve kriyo çubuk içiklerini uzun vadeli saklama için kriyo dondurucuya aktarın.

B. EMBRİYOLAR (PN'den Blastokiste)

Vitrifikasyon Protokolü:

- Bir adet 50 µL'lık ES damlasını ters çevrilmiş bir Petri tabağı kapakı üzerine aseptik olarak koyun.
- Mümkün olduğu durumlarda vitrifikasyon için yalnızca en iyi kalite embriyoları seçin.
- Minimal medyum hacmiyle ömeği (bir kereden en fazla 2 tane) kültür tabağından alıp ES damlasının aktarın. Embriyolar ES damlası içinde 6-10 dakika boyunca serbest düşüş yoluyla dengelenecektir.

Not: Örnek küçülecek sonra normal boyuna geri dönecektir. Bu durum dengelenmenin tamamlandığına işaret eder.

DİKKAT: ES ve VS damlaları içinde dengeleme sırasında örneğin (veya örneklerin) ısığa maruziyetini minimize edin.

- ES içindeki bu dengelenme süresi sırasında:**
 - Şekil 7'de gösterildiği gibi (1) 50 µL damla VS solüsyonu hazırlayın (Şekil 2) ve Kriyo Ucu veya HSV Payeti yüklemeye için hazırlayın.

Yukarıda yazıldığı şekilde (Bölüm A – Oosit [MIİ] Vitrifikasyon Protokolü) VS solüsyonlarına maruziyet, Kriyo Ucu veya HSV Payetin yüklenmesi, LN2'ye batırılması ve uzun vadeli saklama için 8. adımdan 15. adıma kadar prosedürü takip edin.

Bu ürünlerin kullanımları ilgili ek ayrıntılar için, her laboratuvar, kendi medikal programınız için özel olarak geliştirilmiş ve optimize edilmiş olan kendi laboratuvar prosedürlerine ve protokollerine başvurulmalıdır.

SAKLAMA TALİMATI VE STABİLİTE:

Açılmamış flakonları 2°C - 8°C'de buzdolabında saklayın. Talimat verildiği şekilde saklandığında Vitrifikasyon Dondurma Kiti Solüsyonları flakon etiketlerinde gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

Kaplar açıldıktan sonra ortamları sekiz (8) haftadan fazla kullanmayın.

Üründe insan kaynaklı materyal bulunduğuundan saklama sırasında bazı partiküller gelişebilir. Bu tür partiküller ürün performansına bir etkisi olduğu bilinmemektedir.

ÖNLEMLER VE UYARILAR

Bu cihaz, cihazla ilgili olarak tanımlanan uygulamaları da kapsayan yardımla üreme prosedürlerinde eğitimli personel tarafından kullanıma yönelik olarak tasarlanmıştır. Hazırlama prosedürü sırasında ek bir önlem olarak, her bir Kriyo Ucu paketten çıkarılırken dikkatle incelenmesini tavsiye ediyoruz. Kullanım öncesinde Kriyo Uclar taşıma sırasında meydana gelişmiş olabilecek olası hasarlara karşı (uç kırılmaları veya çatlamaları gibi) uygun bir büyüme (40x) altında incelenmelidir. Partikülat madde veya bulanıklık kanıtları sergileyen herhangi bir solüsyon yıyali kullanmayın.

Kontaminasyon sorunlarından sakınmak için aseptik teknikler kullanın.

Vitrifikasyon Dondurma Kiti Solüsyonları antibiyotik Gentamisin Sülfat içerir. Hastanın bu antibiyotiğe aşırı hassas olmadığının emin olunması için uygun önlemler alınmalıdır. Şu anda, araştırma literatürü, vitrifikasyonun embriyolar üzerindeiki uzunvadeli etkilerinin hala bilinmediğini göstermektedir.

*** Bu ürünün üretiminde kullanılan insan kanı türevleri FDA lisanslı kitlerle test edilmiş ve içeriğin Hepatit B Yüzey Antijeni, Hepatit C antikorları ve İnsan Bağışıklık Eksikliği Virüsü (HIV) antikorları açısından tepkisiz olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, hiçbir test yöntemi, insan kaynaklarından türetilen ürünlerin non-infeksiyöz olduğu konusunda tam güvence sunmaz. Tüm insan kanı türevlerini enfeksiyon yayma potansiyeline sahipmiş gibi, evrensel önlemler olarak kullanın. Kaynak madde donörleri Cruetzfeldt-Jakob Hastalığı kontrolünden de geçirilmiştir.**

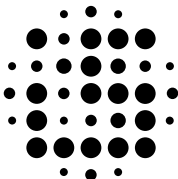
Steril ambalajlamaya ilgili herhangi bir eksiklik veya sorun taşıyan hiçbir şeyi kullanmayın.

Dikkat: Federal (ABD) yasalar bu cihazın bir doktor tarafından satılması veya sipariş edilmesi sınırlamasını getirmektedir.

REFERENCES

1. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Liebo SP. Highly efficient vitrification of human oocytes. *RBM Online* 11:300-308, 2005.
2. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *RBM Online* 11:53-57, 2005.
3. Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 84:88-92, 2005.
4. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *RBM Online* 11:608-614, 2005.
5. Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira de Silva J, Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Human Reproduction* 19, 300-305, 2004.
6. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wasa S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 18:384-391, 2003.
7. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization- embryo transfer program. *Fertil Steril* 79:1323-1326, 2003.
8. Mukaida T, Takahashi K, Kasai M. Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *RBM Online* 6: 221-225, 2002.
9. Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, and Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum. Reprod.* 15:1802-1803, 2000.
10. Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SE, Ko JJ, and Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril.* 74:180-181, 2000.
11. Chen S-U, Lien Y-R, Cheng Y-Y, Chen H-F, Ho H-N and Yang Y-S. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.* 16: 2350-2356, 2001.
12. Isachenko V, Selman H, Isachenko E, Montag M, El-Danasouri I, and Nawroth F. Modified vitrification of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure. *Reproductive BioMedicine Online* 7,211-216, 2003.
13. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Hum. Reprod.* 12:1554-1560, 1997.
14. Walker DL, Tummon IS, Hammitt DG, Session DR, Dumesic DA, Thornhill AR. Vitrification versus programmable rate freezing of late stage murine embryos: a randomized comparison prior to application in clinical IVF. *Reprod. BioMed Online* 8: 558-568, 2004.
15. Kasai M. Vitrification: a refined strategy for the preservation of mammalian embryos. [Review] *J. Mamm. Ova Res.*, 14:17-28, 1997.
16. Ohta N, Nohara M and Kojimahara T. Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method, A case of delivery. *Jpn. J. Fertil. Steril.* 41:276-279, 1996.
17. Feichtinger W, Hochfellner C, and Ferst C. Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. *Hum. Reprod.*, 6:735-736, 1991.
18. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402, 1987.
19. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575, 1985.

GASTIGHT® is a Registered Trademark of Hamilton Co.



IrvineScientific®

2511 Daimler Street, Santa Ana, California 92705-5588

Telephone: 1 949 261 7800 • 1 800 437 5706

Fax: 1 949 261 6522 • www.irvinesci.com

PN 40695 Rev.17