

## Vit Kit - Freeze NX (Vitrification Kit for Freezing) with Gentamicin and DSS

### Catalog No. 90188 Includes:

- Equilibration NX - ES (white cap)	3 x 1 mL
- Vitrification NX - VS (blue cap)	3 x 1 mL
- Washing NX - WS (red cap)	1 x 1 mL

For assisted reproductive procedures.

Für assistierte Reproduktionsverfahren.

Per tecniche di riproduzione assistita.

Para utilización en técnicas de reproducción asistida.

Pour techniques de procréation médicalement assistée.

Para técnicas de reprodução assistida.

Για διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Pro postupy asistované reprodukce.

Til assisteret reproduktionsbehandling.

Avusteisiin lisäantymismenetelmiin.

Ar palīgīdzekļiem veicamām reproduktīvām procedūrām.

Voor geassisteerde voortplantingsprocedures.

Do procedur wspomaganego rozrodu.

Penru proceduri de reproducere asistată.

För procedurer för assisterad befruktning.

Kasutamiseks abistatud viljastamisprotseduurides.

Asszisztált reprodukciós eljárásokhoz.

Skirta pagalbinio apvaisinimo procedūroms.

Yardımcı üreme işlemleri içindir.

Na postupy asistovanej reprodukcie.

За процедури за асистирана репродукция.

Za postupke potpomognute oplodnje.

Għall-proċeduri ta' riproduzzjoni assistita.

Za postopke asistirane reprodukcije.

### Glossary of Symbols\*:



Catalog Number



Lot Number



Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)



Expiration:  
Year - Month - Day



Caution, consult accompanying documents



Consult instructions for use



Storage Temperature  
2-8°C



Do Not Re-Sterilize



Do Not Use If Package Is Damaged



Phthalate, DBP, DEHP



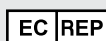
Manufacturer



U.S. Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare practitioner.



CE Mark



Emergo Europe - Westervoortsedijk 60  
6827 AT Arnhem  
The Netherlands

\*Symbol Reference - EN ISO 15223-1, Medical devices – Symbols to be used with medical device labels, labeling.

FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.

2511 Daimler Street, Santa Ana, California 92705 USA

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

© 2023 FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. All rights reserved. FUJIFILM Irvine Scientific, its logo, Continuous Single Culture and Vit Kit, are registered trademarks of FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. in various jurisdictions. All other trademarks are the property of their respective owners.

PN 41101-EU Rev.02

Effective Date: 31-JUL-2023

Figure 1

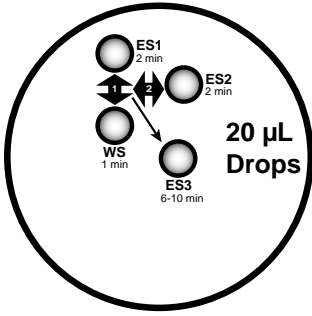


Figure 2

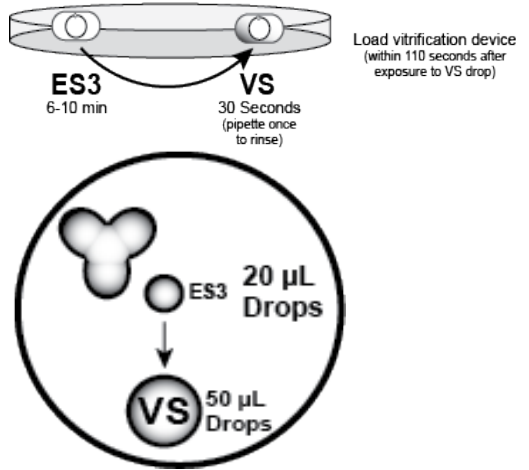


Figure 3

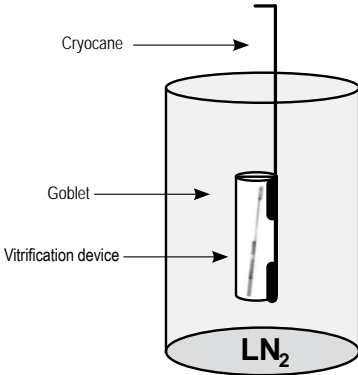
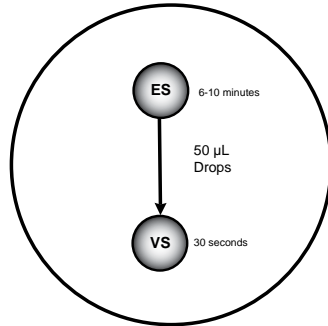


Figure 4



## ENGLISH

**EU CAUTION:** For Professional Use Only.

### INTENDED USE

Vit Kit - Freeze NX is intended for use in assisted reproductive procedures for vitrification and storage of human oocytes (MII), pronuclear (PN) zygotes through day 3 cleavage stage embryos and blastocyst stage embryos.

### DEVICE DESCRIPTION

**Equilibration NX - ES** is a dual buffered solution (HEPES & MOPS) of Continuous Single Culture medium (CSCM) containing Gentamicin Sulfate, 7.5% (v/v) of each DMSO and ethylene glycol, and 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX - VS** is a dual buffered solution (HEPES & MOPS) of CSCM containing Gentamicin Sulfate, 15% (v/v) of each DMSO and ethylene glycol, 20% (v/v) DSS and 0.5 M Trehalose.

**Washing NX - WS** is a dual buffered solution (HEPES & MOPS) of CSCM containing Gentamicin Sulfate and 20% DSS.

DSS is a protein supplement consisting of 50 mg/mL therapeutic grade Human Serum Albumin (HSA) and 20 mg/mL Dextran. DSS is used at 20% (v/v) in Vit Kit – Freeze NX for a final concentration of 10 mg/mL HSA and 4 mg/mL Dextran.

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

### COMPOSITION

#### Salts & Ions

Potassium Phosphate  
Sodium Chloride  
Potassium Chloride  
Magnesium Sulfate  
Calcium Chloride

#### Amino Acids

L-Arginine  
Glycine  
L-Histidine  
L-Lysine  
L-Proline  
L-Tyrosine  
L-Alanine  
L-Aspartic Acid  
L-Asparagine  
L-Glutamic Acid  
L-Isoleucine  
L-Leucine  
L-Alanyl-L-Glutamine  
L-Methionine

L-Phenylalanine  
L-Serine  
L-Threonine  
L-Tryptophan  
L-Valine  
L-Cystine

#### Antioxidants

Sodium Citrate  
EDTA

#### Antibiotics

Gentamicin Sulfate

#### Energy Substrates

Dextrose  
Sodium Pyruvate  
Sodium Lactate

#### Protein

Human Serum Albumin, HSA

#### Cryoprotectants

Dextran  
Trehalose  
Ethylene Glycol  
Dimethylsulfoxide

#### Buffer

Sodium Bicarbonate  
HEPES  
MOPS

### QUALITY ASSURANCE

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

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

- Endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) methodology ( $\leq 0.6$  EU/mL) by USP Bacterial Endotoxins <85> and Ph. Eur. 2.6.14
- Mouse Embryo Assay (one-cell) ( $\geq 80\%$  expanded blastocyst)
- Sterility by the current USP Sterility Test <71>, Ph. Eur. 3.2 (Pass)

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

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Vitrification device of choice
- Sterile petri dishes (50 X 9 mm, Falcon 351006 or equivalent)
- Cryotubes (4.5 mL) or goblets and cryocanes
- Hyaluronidase (Catalog #90101) for oocyte vitrification
- Disposable gloves
- Transfer pipettes (pulled glass pipettes or micropipette tips with an inner tip diameter of  $\sim 200\mu\text{m}$ )
- Tweezers or forceps
- 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 NX component requirements (per application):

- Equilibration NX – ES (ES):  
60  $\mu\text{L}$  for Oocyte Vitrification Protocol  
Or  
50  $\mu\text{L}$  for Embryo Vitrification Protocol
- Vitrification NX – VS (VS):  
50  $\mu\text{L}$  for either Vitrification Protocol
- Washing NX – WS (WS):  
20  $\mu\text{L}$  for Oocyte Vitrification Protocol

## VITRIFICATION PROTOCOL:

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

1. Bring the quantity to be used of ES, VS, and WS to room temperature (20-27°C).

NOTE: Avoid bringing the entire vials of ES, VS and WS 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. Washing NX (WS) is used for oocyte vitrification.

2. Fill the liquid nitrogen reservoir with liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) – sufficient to achieve a depth of 4 inches or to completely submerge cryotube on cane – and place close to microscope. Attach a cryotube or goblet (uncapped) to the bottom clamp of a cryocane and submerge in the liquid nitrogen in preparation for storage of the vitrified specimens.
3. Determine the number of specimens to be vitrified.
4. Label each sterile petri dish (or lid) and Cryo storage device with necessary information.
5. Carefully examine the vitrification device before starting procedure
6. Gently invert each vial of ES and VS to mix contents before use.
7. Prepare dish with droplets of solutions for Vitrification Procedure as follows:

### A. OOCYTE (MII) Vitrification Protocol:

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

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

1. Aseptically dispense 20 µL drop of WS, ES1 & ES2 in close proximity and ES3 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 WS
  - three- 20 µL drops (60 µL total) of ES (ES1, ES2, ES3)
2. Remove the culture dish containing MII oocytes from the incubator and check the quality of the specimens under microscope. Where possible, select only the best quality MII stage oocyte(s).  
CAUTION: Minimize the exposure of the specimen(s) to light during equilibration in the WS, ES and VS drops.
3. Transfer the oocyte (up to 2 at a time) with minimal volume of medium from the culture dish (in incubator) into the 20 µL drop of WS for one minute.
4. Merge the drop of WS to ES1 (See Figure 1, arrow 1) with the tip of the transfer pipette and allow spontaneous mixing of the two solutions to occur for 2 minutes.
5. Then merge the drop of ES2 (arrow 2) to the previously merged drops and leave for 2 minutes.
6. Transfer the oocyte(s) with minimal volume of solution from merged drop to ES3 drop for 6-10 minutes.

Note: equilibration of oocyte(s) in ES3 is complete when the thickness of the zona pellucida and perivitelline space is equal. The oocyte(s) will settle to the bottom of the drop typically within 3 minutes.

7. During the equilibration time in ES3, aseptically dispense one (1) 50 µL drop of VS prior to complete equilibration and prepare the Vitrification device of choice for loading (Figure 2).
8. The following steps (9-13) should be completed in 80-110 seconds.

CAUTION: Exposure of specimens to VS should be limited to prevent cytotoxicity. Specimen(s) tend to float in VS, so adjust the focus through the microscope to maintain continuous visualization during exposure and keep the tip of the transfer pipette nearby to assure rapid transfer between drops. Refer to Figure 2.

9. Rinse and fill the transfer pipet tip with VS immediately before equilibration in ES is complete, and draw up the specimen(s) with minimal volume of ES into the pipet tip and transfer into the drop of VS for 50-60 seconds. Unload oocytes to the bottom of VS. While unloading, oocytes will float to the top of VS. To ensure complete rinse with VS, gently move the oocytes back to the bottom center of VS by pipetting.

During this process, oocytes will be dehydrated and float back again.

10. Load and seal the Vitrification device as directed by manufacturer.
11. Place the vitrified specimen(s) on the Vitrification device of choice into the submerged LN<sub>2</sub> filled cryotube or goblet (on the cryocane) Figure 3. Cap the cryotube (or goblet) or attach up-side-down with another uncapped cryotube in order to secure the vitrified device in liquid nitrogen.
12. Move the LN<sub>2</sub> reservoir close to the LN<sub>2</sub> cryo-freezer and transfer the cryocane with contents to the cryo-freezer for long-term storage.

### B. EMBRYOS (PN to Blastocyst) Vitrification Protocol:

1. Aseptically dispense one- 50 µL drop of ES on an inverted lid of Petri dish (Figure 4).
2. Remove the culture dish with embryo(s) from the incubator and check the quality of the specimen(s) under microscope. Where possible, select only the best quality embryo(s) for vitrification.
3. 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 1: The specimen will shrink and then gradually return to its original size, which indicates that the equilibration is complete.

CAUTION: Minimize the exposure of specimen(s) to light during equilibration in ES and VS drops.

4. During this equilibration time in ES, aseptically dispense one-50 µL drop of VS solution as shown in Figure 4 and prepare vitrification device of choice for loading.
5. Rinse and fill the transfer pipet tip with VS immediately before equilibration in ES is complete, and draw up the specimen(s) with

minimal volume of ES into the pipet tip and transfer into the drop of VS for a minimum of 30 seconds. Unload embryos to the bottom of VS. While unloading, embryos will float to the top of VS. To ensure complete rinse with VS, gently move the embryos back to the bottom center of VS by pipetting.

NOTE 2: During this process, embryos will be dehydrated and float back again.

6. Load and seal the Vitrification device as directed by manufacturer
7. Place the vitrified Vitrification device of choice into the submerged LN<sub>2</sub> filled cryotube or goblet (on the cryocane) — Figure 3. Cap the cryotube (or goblet) or attach up-side-down with another uncapped cryotube in order to secure the vitrified device in liquid nitrogen.
8. Move the LN<sub>2</sub> reservoir close to the LN<sub>2</sub> cryo-freezer and transfer the cryocane with contents to the cryo-freezer for 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, Vit Kit – Freeze NX Solutions are stable until the expiration date shown on the vial labels.

Do not use media for more than fourteen (14) days once containers have been opened.

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

#### **PRECAUTIONS AND WARNINGS**

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

The user facility of this device is responsible for maintaining traceability of the product and must comply with national regulations regarding traceability, where applicable.

Do not use any vial of solution which shows evidence of damage, leaking, particulate matter, cloudiness. Discard the product in accordance with applicable regulations.

To avoid problems with contamination, handle using aseptic techniques.

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

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

**EU:** Standard measures to prevent infections resulting from the use of medicinal products prepared from human blood or plasma include selection of donors, screening of individual donations and plasma pools for specific markers of infection and the inclusion of effective manufacturing steps for the inactivation/removal of viruses. Despite this, when medicinal products prepared from human blood or plasma are administered, the possibility of transmitting infective agents cannot be totally excluded. This also applies to unknown or emerging viruses and other pathogens. There are no reports of proven virus transmissions with albumin manufactured to European Pharmacopeia specifications by established processes. It is strongly recommended that every time FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. Reproductive Media Products culture media are administered to a patient, the name and batch number of the product are recorded in order to maintain a link between the patient and the batch of the product.

**US:** This product contains Human Serum Albumin (HSA). Human source material used in the manufacture of this product has been tested by FDA-licensed kits and found to be non-reactive to the antibodies to Hepatitis C (HCV), and antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV). However, no test method offers complete assurance that products derived from human sources are noninfectious. Handle all human source material as if it were capable of transmitting infection, using universal pre-cautions. Donors of the source material have also been screened for CJD.

#### **CONTRAINDICATION**

Product contains Gentamicin Sulfate. Appropriate precautions should be taken to ensure that the patient is not sensitized to this antibiotic.



# DEUTSCH

**EU-VORSICHTSHINWEIS:** Nur für den professionellen Einsatz.

## VERWENDUNGSZWECK

Vit Kit – Freeze NX ist für die Verwendung bei assistierten Reproduktionsverfahren zur Vitrifikation und Lagerung menschlicher Oozyten (MII) und Zygoten im Vorkernstadium (PN) bis zu Embryos im Teilungsstadium am Tag 3 und Blastozystenstadium vorgesehen.

## PRODUKTBESCHREIBUNG

**Equilibration NX-ES** ist eine dual-gepufferte Lösung (HEPES & MOPS) des Continuous Single Culture Medium (CSCM) und enthält Gentamicinsulfat, 7,5 % (v/v) sowohl DMSO als auch Ethylenglykol sowie 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX-VS** ist eine dual-gepufferte Lösung (HEPES & MOPS) des CSCM-Mediums und enthält Gentamicinsulfat, 15 % (v/v) sowohl DMSO als auch Ethylenglykol, 20 % (v/v) DSS und 0,5 M Trehalose.

**Washing NX-VS** ist eine dual-gepufferte Lösung (HEPES & MOPS) des CSCM-Mediums und enthält Gentamicinsulfat sowie 20 % DSS.

DSS ist ein Proteinzusatz und setzt sich aus 50 mg/ml Humanalbumin (HSA, für therapeutische Zwecke geeignet) und 20 mg/ml Dextran zusammen. DSS wird zu 20 % (v/v) im Vit Kit – Freeze NX bei einer Endkonzentration von 10 mg/ml HSA und 4 mg/ml Dextran verwendet.

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

## ZUSAMMENSETZUNG

### Salze und Ionen

Kaliumphosphat  
Natriumchlorid  
Kaliumchlorid  
Magnesiumsulfat  
Calciumchlorid

### Aminosäuren

L-Arginin  
Glycin  
L-Histidin  
L-Lysin  
L-Prolin  
L-Tyrosin  
L-Alanin  
L-Asparaginsäure  
L-Asparagin  
L-Glutaminsäure  
L-Isoleucin  
L-Leucin  
L-Alanyl-L-Glutamin  
L-Methionin

L-Phenylalanin  
L-Serin  
L-Threonin  
L-Tryptophan  
L-Valin  
L-Cystin

### Energiesubstrate

Dextrose  
Natriumpyrovat  
Natriumlactat

### Puffer

Natriumbicarbonat  
HEPES  
MOPS

### Antioxidantien

Natriumcitrat  
EDTA

### Protein

Humanalbumin (HSA)

### Kryoprotektoren

Dextran  
Trehalose  
Ethylenglykol  
Dimethylsulfoxid

### Antibiotika

Gentamicinsulfat

## QUALITÄTSSICHERUNG

Die Membranfiltration und aseptische Verarbeitung der Lösungen im Vit Kit – Freeze NX erfolgt in Übereinstimmung mit validierten Fertigungsverfahren.

Jede Charge von Vit Kit – Freeze NX unterläuft folgende Tests:

- Endotoxin durch Limulus-Amoebocyten-Lysat-Nachweis (LAL-Methode) ( $\leq 0,6$  EU/ml) durch USP Bacterial Endotoxin Test <85> und Eur. Arzneibuch 2.6.14
- Mausembryo-Assay (einzellig) ( $\geq 80$  % expandierte Blastozysten)
- Sterilität durch aktuellen USP-Sterilitätstest <71>, Eur. Arzneibuch 3.2 (Bestanden)

Alle Ergebnisse sind einer chargenspezifischen Analysebescheinigung zu entnehmen, die auf Anfrage erhältlich ist.

## BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND:

- Vitrifikationsgerät nach Wahl
- Sterile Petrischalen (50 X 9 mm, Falcon 351006 oder gleichwertig)
- Kryoröhrchen (4,5 ml) oder Becher und „Cryocanes“ (Kryoröhrchen-Halter)
- Hyaluronidase (Bestell-Nr. 90101) für die Vitrifikation von Oozyten
- Einmalhandschuhe
- Transferpipetten (Pipetten aus gezogenem Glas oder Mikropipetten-Spitzen mit einem Innendurchmesser von ca. 200  $\mu$ m)
- Pinzetten
- Stoppuhr oder Zeitgeber
- Flüssigstickstoff-Vorratsbehälter (Dewar- oder Styroporbehälter mit Deckel, Volumen 1-2 l)
- Flüssigstickstoff (ausreichendes Volumen für eine Tiefe von ca. 4 Zoll im Vorratsbehälter)

## GEBRAUCHSANWEISUNG

Vit Kit – Freeze NX Komponentenbedarf (pro Anwendung):

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l für Oozyten-Vitrifikationsprotokoll  
Oder  
50  $\mu$ l für Embryo-Vitrifikationsprotokoll
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ l für beide Vitrifikationsprotokolle
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ l für Oozyten-Vitrifikationsprotokoll

## VITRIFIKATIONSPROTOKOLL:

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

1. Die benötigte Menge an ES (Äquibrierungslösung), VS (Vitrifikationslösung) und WS (Waschlösung) auf Raumtemperatur (20–27 °C) bringen.  
HINWEIS: Es sollte vermieden werden, die Fläschchen mit der gesamten Menge an ES, VS und WS wiederholt auf Raumtemperatur zu bringen, wenn jeweils nur ein kleiner Anteil davon gebraucht wird. Es ist besser, nur die benötigte Menge zu entnehmen und die Fläschchen gleich nach der Entnahme wieder bei 2–8 °C kühl zu stellen. Washing NX (WS) wird für die Oozyten-Vitrifikation verwendet.
2. Den Flüssigstickstoff-Vorratsbehälter mit so viel Flüssigstickstoff (LN<sub>2</sub>) anfüllen, dass eine Tiefe von 4 Zoll erreicht wird oder dass die Kryoröhrchen am Cryocane vollständig eingetaucht werden können, und neben dem Mikroskop aufstellen. Ein Kryoröhrchen oder einen Becher (ohne Deckel) an der unteren Klemme eines Cryocane befestigen und in Flüssigstickstoff tauchen, um die Lagerung der vitrifizierten Proben vorzubereiten.
3. Die Anzahl der zu vitrifizierenden Proben ermitteln.
4. Jede sterile Petrischale (bzw. jeden Deckel) und die Kryolagerungsvorrichtung mit den notwendigen Informationen beschriften.
5. Das Vitrifikationsgerät vor Start des Verfahrens sorgfältig prüfen.
6. Vor dem Gebrauch den Inhalt jedes Fläschchens mit ES und VS durch vorsichtiges Umdrehen mischen.
7. Die Schale mit Tröpfchen der Lösung für das Vitrifikationsverfahren wie folgt vorbereiten:

### A. Vitrifikationsprotokoll für OOZYTEN (MII):

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

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

1. Unter Einsatz einer aseptischen Technik jeweils einen 20-µl-Tropfen von WS, ES1 und ES2 (dicht nebeneinander) sowie von ES3 auf den umgedrehten Deckel einer sterilen Petrischale geben, wie in Abbildung 1 dargestellt, und die Schale auf den Objektträger stellen:
  - Ein 20-µl-Tropfen WS
  - Drei 20-µl-Tropfen (insgesamt 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Die Kulturschale mit den MII-Oozyten aus dem Inkubator entnehmen und die Qualität der Proben unter dem Mikroskop prüfen. Möglichst nur die hochwertigste(n) Oozyte(n) im MII-Stadium auswählen.  
VORSICHT: Die Probe(n) bei einer Äquibrierung in WS-, ES- und VS-Tropfen so weit wie möglich vor Lichtexposition schützen.
3. Die Oozyte(n) (bis zu 2 gleichzeitig) mit einem minimalen Mediovolumen aus der Kulturschale (im Inkubator) auf den 20-µl-Tropfen WS überführen und 1 Minute warten.
4. Den Tropfen WS mithilfe der Spitze der Transferpipette zum ES1 geben (siehe Abbildung 1, Pfeil 1) und 2 Minuten lang warten, um eine spontane Mischung beider Lösungen zu ermöglichen.
5. Dann den Tropfen ES2 (Pfeil 2) zu den zuvor gemischten Tropfen geben und 2 Minuten warten.
6. Die Oozyte(n) mit minimalem Lösungsvolumen aus dem gemischten Tropfen auf den ES3-Tropfen überführen und 6–10 Minuten warten.
7. Während der Äquibrierungszeit in ES3 unter Einsatz einer aseptischen Technik vor Abschluss der Äquibrierung einen (1) 50-µl-Tropfen VS dispensieren und das gewählte Vitrifikationsgerät zum Beladen vorbereiten (Abbildung 2).
8. Folgende Schritte (9–13) sind innerhalb von 80–110 Sekunden durchzuführen.

VORSICHT: Die Proben sollten VS nur begrenzt ausgesetzt werden, um eine Zytotoxizität zu vermeiden. Proben neigen dazu, in VS zu schweben; daher sollte das Mikroskop so fokussiert werden, dass während der Exposition eine kontinuierliche Visualisierung aufrechterhalten bleibt. Außerdem die Spitze der Transferpipette in der Nähe halten, um einen schnellen Transfer zwischen den Tropfen zu gewährleisten. Siehe Abbildung 2.

9. Unmittelbar vor Abschluss der Äquibrierung in ES die Spitze der Transferpipette mit VS spülen und anfüllen. Die Proben mit minimalem ES-Volumen in die Pipettenspitze aufziehen und für einen Zeitraum von 50–60 Sekunden auf den VS-Tropfen übertragen. Die Oozyten auf den Grund des VS-Tropfens dispensieren. Während der Dispensierung steigen die Oozyten im VS-Tropfen wieder nach oben. Um eine komplette Spülung mit VS sicherzustellen, die Oozyten durch Pipettieren wieder vorsichtig zur Grundmitte des VS-Tropfens zurückbewegen.  
Bei diesem Prozess werden die Oozyten dehydriert und schweben wieder zurück.
10. Das Vitrifikationsgerät gemäß den Herstelleranweisungen beladen und verschließen.
11. Die vitrifizierte(n) Probe(n) im gewählten Vitrifikationsgerät in das eingetauchte, mit LN<sub>2</sub> gefüllte Kryoröhrchen oder den Becher (am Cryocane) geben – siehe Abbildung 3. Das Kryoröhrchen (oder den Becher) mit dem Deckel verschließen oder umdrehen und mit einem anderen deckellosen Kryoröhrchen befestigen, um das vitrifizierte Gerät in Flüssigstickstoff zu sichern.
12. Den LN<sub>2</sub>-Vorratsbehälter neben dem LN<sub>2</sub>-Kryogefrierer aufstellen und den Inhalt des Cryocane für eine langfristige Aufbewahrung der Proben in den Kryogefrierer überführen.

### B. Vitrifikationsprotokoll für EMBRYOS (PN bis Blastozysten):

1. Unter Einsatz einer aseptischen Technik einen 50-µl-Tropfen ES auf den umgedrehten Deckel einer Petrischale geben (Abbildung 4).
2. Die Kulturschale mit dem (den) Embryo(s) aus dem Inkubator entnehmen und die Qualität der Probe(n) unter dem Mikroskop prüfen. Möglichst nur den (die) hochwertigsten Embryo(s) für die Vitrifikation auswählen.



3. Die Probe(n) (bis zu zwei gleichzeitig) vorsichtig mit einem minimalen Medienvolumen von der Kulturschale auf den Tropfen ES überführen und den Zeitgeber starten.  
Embryos sollten im ES-Tropfen langsam durch freien Fall 6–10 Minuten lang äquilibrieren.  
HINWEIS 1: Die Proben schrumpfen und kehren dann schrittweise wieder zur ursprünglichen Größe zurück. Dies weist darauf hin, dass die Äquilibration abgeschlossen ist.  
VORSICHT: Proben bei einer Äquilibration in ES- und VS-Tropfen so weit wie möglich vor Lichtexposition schützen.
4. Während der Äquilibrationszeit in ES einen 50- $\mu$ l-Tropfen VS-Lösung unter Einsatz einer aseptischen Technik dispensieren (siehe Abbildung 4) und das gewählte Vitrifikationsgerät zum Beladen vorbereiten.
5. Unmittelbar vor Abschluss der Äquilibration in ES die Spitze der Transferpipette mit VS spülen und anfüllen. Die Proben mit minimalem ES-Volumen in die Pipettenspitze aufziehen und auf den VS-Tropfen für einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden übertragen. Die Embryos am Boden des VS-Tropfens entleeren. Während der Entleerung steigen die Embryos im VS-Tropfen wieder nach oben. Um eine komplette Spülung mit VS sicherzustellen, die Embryos durch Pipettieren wieder vorsichtig zur Bodenmitte des VS-Tropfens zurückbewegen.  
HINWEIS 2: Bei diesem Prozess werden die Embryos dehydriert und schweben wieder zurück.
6. Das Vitrifikationsgerät gemäß den Herstelleranweisungen beladen und verschließen.
7. Das vitrifizierte gewählte Vitrifikationsgerät in das eingetauchte, mit LN gefüllte Kryoröhrchen oder den Becher (am Cryocane) geben (siehe Abbildung 3). Das Kryoröhrchen (oder den Becher) mit dem Deckel verschließen oder umdrehen und mit einem anderen deckellosen Kryoröhrchen befestigen, um das vitrifizierte Gerät in Flüssigstickstoff zu sichern.
8. Den LN-Vorratsbehälter neben dem LN-Kryogefrierer aufstellen und den Inhalt des Cryocane für eine langfristige Aufbewahrung der Proben in den Kryogefrierer überführen.

Weitere Einzelheiten zum Gebrauch dieser Produkte sind den Verfahren und Vorschriften des jeweiligen Labors zu entnehmen, die eigens für das jeweilige medizinische Programm entwickelt und optimiert wurden.

#### **LAGERUNGSANWEISUNGEN UND STABILITÄT**

Die ungeöffneten Fläschchen bei 2 °C bis 8 °C gekühlt lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung sind die Vit Kit – Freeze NX Solutions bis zu dem auf der Kennzeichnung der Fläschchen angegebenen Verfallsdatum stabil.

Die Medien nach Öffnen der Behälter nicht länger als vierzehn (14) Tage verwenden.

Da menschliches Ausgangsmaterial im Produkt vorhanden ist, können sich während der Lagerung sichtbare Partikel bilden. Diese Partikel haben keinen nachweislichen Einfluss auf die Produktleistung.

#### **VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE**

Dieses Produkt ist für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in assistierten Reproduktionsverfahren geschult ist. Zu diesen Verfahren zählt der Anwendungsbereich, für den dieses Produkt vorgesehen ist.

Die Einrichtung des Anwenders ist für die Rückverfolgbarkeit des Produkts verantwortlich und muss alle einschlägigen geltenden Bestimmungen zur Rückverfolgbarkeit einhalten.

Fläschchen mit Lösung, die Schäden oder Leckagen aufweisen, sichtbare Partikel enthalten oder getrübt sind, nicht verwenden. Das Produkt gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgen.

Um Kontaminationsprobleme zu vermeiden, bei der Handhabung immer aseptische Techniken einsetzen.

Aus der aktuellen Forschungsliteratur geht hervor, dass die Langzeitwirkungen der Vitrifikation auf Oozyten und Embryos immer noch unbekannt sind.

Keine Flaschen verwenden, deren Sterilverpackung beschädigt wurde.

EU: Zu den Standardmaßnahmen zur Prävention von Infektionen infolge der Verwendung von Arzneimitteln, die aus menschlichem Blut oder Plasma hergestellt sind, gehören die Auswahl der Spender, die Untersuchung der einzelnen Blutspenden und der Plasmapools hinsichtlich spezifischer Infektionsmarker und die Durchführung wirksamer Schritte während der Herstellung zur Inaktivierung/Entfernung von Viren. Dessen ungeachtet kann die Möglichkeit der Übertragung infektiöser Erreger bei Verabreichung von Arzneimitteln, die aus menschlichem Blut oder Plasma hergestellt sind, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies gilt auch für unbekannte oder neu auftretende Viren und sonstige Pathogene. Es liegen keine Berichte über bestätigte Virusübertragungen mit Albumin vor, das nach den Spezifikationen des Europäischen Arzneibuchs mit etablierten Verfahren hergestellt wurde. Es wird dringend empfohlen, dass bei jeder Verwendung eines Reproduktionsmediums von FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. für Patienten der Name und die Chargenbezeichnung des Produktes protokolliert werden, um nachverfolgen zu können, welche Produktcharge bei welchem Patienten angewendet wurde.

USA: Dieses Produkt enthält Humanalbumin (HSA). Für die Herstellung dieses Produkts verwendetes Material menschlichen Ursprungs wurde mit von der FDA zugelassenen Testkits geprüft und erwies sich als nicht reaktiv im Hinblick auf Antikörper gegen Hepatitis C (HCV) und Antikörper gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV). Kein Testverfahren kann jedoch mit vollständiger Sicherheit ausschließen, dass Produkte menschlichen Ursprungs infektiös sind. Alle Materialien menschlichen Ursprungs sind unter Einhaltung der universellen Vorsichtsmaßnahmen so zu handhaben, als ob sie eine Infektion übertragen könnten. Spender der Ausgangsmaterialien wurden auch auf Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) überprüft.

#### **KONTRAINDIKATIONEN**

Das Produkt enthält Gentamicinsulfat. Es ist anhand angemessener Vorsichtsmaßnahmen sicherzustellen, dass der Patient keine Sensitivität gegenüber diesem Antibiotikum aufweist.



**AVVERTENZA PER LA UE:** solo per uso professionale.

### USO PREVISTO

Vit Kit - Freeze NX è indicato per l'uso nelle tecniche di riproduzione assistita per la vitrificazione e la conservazione di ovociti umani (MI), embrioni tra lo stadio di zigoti pronucleati (PN) e la fase di clivaggio al giorno 3, ed embrioni allo stadio di blastocisti.

### DESCRIZIONE DEL DISPOSITIVO

**Equilibration NX-ES** è una soluzione di Continuous Single Culture Medium (CSCM) contenente due tamponi (HEPES e MOPS) e gentamicina solfato, 7,5% (v/v) ciascuno di DMSO e glicole etilenico, e 20% (v/v) di Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX-VS** è una soluzione di CSCM contenente due tamponi (HEPES e MOPS) e gentamicina solfato, 15% (v/v) ciascuno di DMSO e glicole etilenico, 20% (v/v) di DSS e 0,5 M di trealosio.

**Washing NX-WS** è una soluzione di CSCM contenente due tamponi (HEPES e MOPS), gentamicina solfato e 20% di DSS.

Il DSS è un integratore proteico costituito da 50 mg/ml di albumina sierica umana (HSA) di classe terapeutica e 20 mg/ml di destrano. Viene usato al 20% (v/v) in Vit Kit - Freeze NX per una concentrazione finale di 10 mg/ml di HSA e di 4 mg/ml di destrano.

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

### COMPOSIZIONE

#### Sali e ioni

Fosfato di potassio  
Cloruro di sodio  
Cloruro di potassio  
Solfato di magnesio  
Cloruro di calcio

#### Aminoacidi

L-arginina  
Glicina  
L-istidina  
L-lisina  
L-prolina  
L-tirosina  
L-alanina  
Acido L-aspartico  
L-asparagina  
Acido L-glutammico  
L-isoleucina  
L-leucina  
L-alanil-L-glutamina  
L-metionina

L-fenilalanina  
L-serina  
L-treonina  
L-triptofano  
L-valina  
L-cistina

#### Substrati energetici

Destrosio  
Piruvato di sodio  
Lattato di sodio

#### Tampone

Bicarbonato di sodio  
HEPES  
MOPS

#### Antiossidanti

Citrato di sodio  
EDTA

#### Antibiotici

Gentamicina solfato

#### Proteina

Albumina sierica umana (HSA)

#### Crioprotettanti

Destran  
Trealosio  
Glicole etilenico  
Dimetilsolfossido

### GARANZIA DI QUALITÀ

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

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

- Endotossine, mediante saggio del lisato di amebociti di Limulus (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/ml) e test delle endotossine batteriche (USP <85> ed EP 2.6.14)
- Biocompatibilità, mediante saggio su embrioni unicellulari di topo (con  $\geq 80\%$  di blastocisti espanse)
- Sterilità, mediante gli attuali test appositi USP <71> ed EP 3.2 (esito positivo)

Tutti i risultati sono riportati in un Certificato di analisi specifico per ogni lotto, disponibile su richiesta.

### MATERIALI NECESSARI MA NON IN DOTAZIONE

- Dispositivo di vitrificazione prescelto
- Piastre di Petri sterili (50 x 9 mm, Falcon 351006 o equivalenti)
- Crioprovette (4,5 ml) o goblet e supporti CryoCane
- laluronidasi (n. di catalogo 90101) per la vitrificazione degli ovociti
- Guanti monouso
- Pipette di trasferimento (pipette in vetro tirato o puntali per micropipetta con diametro interno del puntale di 200  $\mu\text{m}$  circa)
- Pinzette o pinze
- Cronometro o timer
- Serbatoio contenente azoto liquido (contenitore dewar o in polistirolo con coperchio, volume di 1-2 litri)
- Azoto liquido (volume sufficiente per ottenere una profondità di 4 pollici nel serbatoio)

### ISTRUZIONI PER L'USO

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu\text{l}$  per il protocollo di vitrificazione degli ovociti oppure  
50  $\mu\text{l}$  per il protocollo di vitrificazione degli embrioni
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu\text{l}$  per entrambi i protocolli di vitrificazione
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu\text{l}$  per il protocollo di vitrificazione degli ovociti

## PROTOCOLLO DI VITRIFICAZIONE

NOTA – Le procedure devono essere eseguite a temperatura ambiente (20-27 °C). Per le seguenti procedure, NON usare un tavolino traslatore del microscopio riscaldato. ATTENZIONE – Ridurre al minimo l'esposizione del campione alla luce durante l'equilibratura nelle soluzioni ES e VS.

1. Portare a temperatura ambiente (20-27 °C) la quantità di ES, VS e WS da utilizzare.  
NOTA – Evitare di portare ripetutamente a temperatura ambiente interi flaconi di ES, VS e WS quando è necessario usare solo una parte delle soluzioni. È preferibile prelevare la quantità da utilizzare e rimettere immediatamente i flaconi in frigorifero a 2-8 °C. La soluzione Washing NX (WS) è usata per la vitrificazione degli ovociti.
2. Riempire il serbatoio appositamente con azoto liquido (LN<sub>2</sub>) in quantità sufficiente per raggiungere una profondità di 4 pollici o per immergere completamente la crioprovetta su supporto; collocare il serbatoio accanto al microscopio. Fissare una crioprovetta o un goblet (senza tappo) nell'alloggiamento inferiore di un supporto CryoCane ed immergerlo nell'azoto liquido per prepararlo alla conservazione dei campioni vitrificati.
3. Determinare il numero di campioni da vitrificare.
4. Riportare le informazioni necessarie su ciascuna piastra di Petri (o coperchio) sterile e su ciascun dispositivo di crioconservazione.
5. Prima di avviare la procedura, esaminare attentamente il dispositivo di vitrificazione.
6. Prima dell'uso, capovolgere delicatamente i flaconi di ES e VS per mescolarne il contenuto.
7. Preparare la piastra con gocce di soluzione per la procedura di vitrificazione come descritto qui di seguito.

### A. Protocollo di vitrificazione degli OVOCITI (MI)

NOTA 1 – Gli ovociti recuperati vengono decumulati con ialuronidasi per confermare che si trovino allo stadio di MI.

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

1. Dispensare in modo asettico gocce da 20 µl di WS, ES1 ed ES2 molto vicine tra loro e di ES3 sul coperchio capovolto di una piastra di Petri sterile come mostrato nella Figura 1, e collocare la piastra sul tavolino traslatore del microscopio:
  - una goccia da 20 µl di WS
  - tre gocce da 20 µl (60 µl in totale) di ES (ES1, ES2, ES3)
2. Estrarre dall'incubatore la piastra di coltura contenente gli ovociti allo stadio di MI e verificare la qualità dei campioni al microscopio. Ove possibile, selezionare solo gli ovociti allo stadio di MI della migliore qualità.  
ATTENZIONE – Ridurre al minimo l'esposizione dei campioni alla luce durante l'equilibratura nelle gocce di WS, ES e VS.
3. Trasferire l'ovocita (fino a 2 alla volta), con un volume minimo di terreno, dalla piastra di coltura (nell'incubatore) alla goccia da 20 µl di WS per un minuto.
4. Unire tra loro le gocce di WS ed ES1 (vedere la Figura 1, freccia 1) con la punta della pipetta di trasferimento e consentire la miscelazione spontanea delle due soluzioni per 2 minuti.
5. Unire quindi la goccia di ES2 (freccia 2) alle gocce unite in precedenza e lasciare riposare per 2 minuti.
6. Trasferire l'ovocita o gli ovociti, con un volume minimo di soluzione prodotta dall'unione delle gocce precedenti, alla goccia di ES3 per 6-10 minuti.

Nota – L'equilibratura dell'ovocita o degli ovociti nella goccia di ES3 è completa quando lo spessore della zona pellucida è uguale a quello dello spazio perivitellino. Generalmente, l'ovocita o gli ovociti si sistemano sul fondo della goccia entro 3 minuti.

7. Durante il periodo di equilibratura nella goccia di ES3, prima del completamento dell'equilibratura, dispensare in modo asettico una (1) goccia da 50 µl di VS e preparare il dispositivo di vitrificazione prescelto per il caricamento (Figura 2).
8. I seguenti passaggi (da 9 a 13) devono essere eseguiti nel giro di 80-110 secondi.  
ATTENZIONE – L'esposizione dei campioni alla VS deve essere limitata per evitare effetti citotossici. I campioni tendono a galleggiare nella VS; regolare quindi la messa a fuoco del microscopio in modo da mantenere la visualizzazione continua durante l'esposizione; tenere vicina la punta della pipetta di trasferimento per assicurare il trasferimento rapido da una goccia all'altra. Vedere la Figura 2.
9. Risciacquare e riempire la punta della pipetta di trasferimento con VS immediatamente prima del completamento dell'equilibratura nella ES; aspirare il campione o i campioni nella punta della pipetta con un volume di ES minimo, quindi trasferirli nella goccia di VS per 50-60 secondi. Espellere gli ovociti dalla pipetta sul fondo della goccia di VS. All'atto dell'espulsione, gli ovociti si portano alla superficie della goccia di VS. Per garantire il completo risciacquo con VS, riportare delicatamente gli ovociti, pipettandoli, al centro del fondo della goccia di VS.  
Durante questo processo, gli ovociti subiscono la disidratazione e tornano alla superficie della goccia.
10. Caricare e sigillare il dispositivo di vitrificazione in base alle istruzioni del fabbricante.
11. Collocare il campione o i campioni vitrificati caricati nel dispositivo di vitrificazione prescelto nella crioprovetta o nel goblet (nel supporto CryoCane) immersi pieni di LN<sub>2</sub> (Figura 3). Tappare la crioprovetta (o il goblet) o collegarla, capovolta, a un'altra crioprovetta priva di tappo per fissare il dispositivo vitrificato in azoto liquido.
12. Spostare il serbatoio di LN<sub>2</sub> vicino al criocongelatore a LN<sub>2</sub> e trasferirvi il supporto CryoCane e il relativo contenuto per la conservazione a lungo termine.

### B. Protocollo di vitrificazione degli EMBRIONI (da PN a blastocisti)

1. Dispensare in modo asettico una goccia da 50 µl di ES sul coperchio capovolto di una piastra di Petri (Figura 4).
2. Estrarre dall'incubatore la piastra di coltura contenente l'embrione o gli embrioni e verificare la qualità dei campioni al microscopio. Ove possibile, selezionare solo gli embrioni della migliore qualità ai fini della vitrificazione.
3. Trasferire con attenzione il campione (fino a due alla volta), con un volume minimo di terreno, dalla piastra di coltura alla goccia di ES e avviare il timer.

L'equilibratura degli embrioni deve avvenire lentamente nella goccia di ES, in caduta libera, per 6-10 minuti.

NOTA 1 – Il campione si contrae e torna quindi gradualmente alle sue dimensioni originali: a questo punto, l'equilibratura è completa.

ATTENZIONE – Ridurre al minimo l'esposizione dei campioni alla luce durante l'equilibratura nelle gocce di ES e VS.

4. Durante questo periodo di equilibratura nella ES, dispensare in modo asettico una goccia da 50 µl di soluzione VS come mostrato nella Figura 4 e preparare il dispositivo di vitrificazione prescelto per il caricamento.
5. Risciacquare e riempire la punta della pipetta di trasferimento con VS immediatamente prima del completamento dell'equilibratura nella ES e aspirare il campione o i campioni nella punta della pipetta, con un volume di ES minimo, e trasferirli nella goccia di VS per 30 secondi al minimo. Espellere gli embrioni dalla pipetta sul fondo della goccia di VS. All'atto dell'espulsione, gli embrioni si portano alla superficie della goccia di VS. Per garantire il completo risciacquo con VS, riportare delicatamente gli embrioni, pipettandoli, al centro del fondo della goccia di VS.  
NOTA 2 – Durante questo processo, gli embrioni subiscono la disidratazione e tornano alla superficie della goccia.
6. Caricare e sigillare il dispositivo di vitrificazione in base alle istruzioni del fabbricante.
7. Collocare il dispositivo di vitrificazione prescelto vitrificato nella criovetetta o nel goblet (nel supporto CryoCane) immersi pieni di LN<sub>2</sub> (Figura 3). Tappare la criovetetta (o il goblet) o collegarla, capovolta, a un'altra criovetetta priva di tappo per fissare il dispositivo vitrificato in azoto liquido.
8. Spostare il serbatoio di LN<sub>2</sub> vicino al criocongelatore a LN<sub>2</sub> e trasferirvi il supporto CryoCane e il relativo contenuto per la conservazione a lungo termine.

Per ulteriori dettagli sull'uso di questi prodotti, il laboratorio deve consultare le procedure e i protocolli specificamente sviluppati e ottimizzati per il proprio programma medico.

#### **ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

Conservare i flaconi ancora chiusi in frigorifero a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Se correttamente conservate, le soluzioni Vit Kit - Freeze NX rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette dei flaconi.

Usare i terreni entro quattordici (14) giorni dall'apertura dei flaconi.

Il prodotto contiene materiale di origine umana; è quindi possibile assistere alla formazione di particolato in fase di conservazione. Questo particolato non ha alcun effetto noto sulle prestazioni del prodotto.

#### **PRECAUZIONI E AVVERTENZE**

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale debitamente addestrato alle tecniche di riproduzione assistita. Queste tecniche includono l'applicazione prevista del prodotto.

La struttura che utilizza questo prodotto è responsabile del mantenimento della sua rintracciabilità e, ove applicabile, deve agire in ottemperanza alle norme di legge sulla rintracciabilità.

Non usare flaconi di soluzione in presenza di danni, perdite, particolato o torbidità. Smaltire il prodotto ai sensi delle norme applicabili.

Per evitare problemi di contaminazione, maneggiare il prodotto utilizzando tecniche asettiche.

Ad oggi, secondo la letteratura scientifica, gli effetti a lungo termine della vitrificazione sugli ovociti e sugli embrioni rimangono sconosciuti.

Non usare flaconi la cui confezione sterile sia stata compromessa.

UE: le misure standard per la prevenzione delle infezioni derivanti dall'utilizzo di prodotti medicinali preparati con sangue o plasma umano includono la selezione dei donatori, lo screening delle singole donazioni e dei pool di plasma per il rilevamento di specifici marcatori di infezione, e l'inclusione di fasi della produzione efficaci ai fini dell'inattivazione e dell'eliminazione dei virus. Nonostante ciò, con la somministrazione di un prodotto medicinale preparato da plasma o sangue umano, non è possibile escludere in modo assoluto la possibilità di trasmissione di agenti infettivi. Ciò vale anche per virus e altri patogeni sconosciuti o emergenti. Non sono stati segnalati casi confermati di trasmissione di virus derivanti dall'utilizzo di albumina prodotta secondo le specifiche della Farmacopea europea con procedimenti stabiliti. Si consiglia vivamente di registrare il nome e il numero di lotto di qualsiasi terreno di coltura per tecniche di riproduzione assistita di FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. somministrato a una paziente al fine di mantenere l'associazione tra la paziente e il lotto del prodotto.

USA: questo prodotto contiene albumina sierica umana (HSA). Il materiale di origine umana usato nella produzione di questo prodotto è stato analizzato mediante test autorizzati dalla FDA ed è risultato non reattivo agli anticorpi del virus dell'epatite C (HCV) e del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Tuttavia, nessuno degli attuali metodi di analisi è in grado di garantire in modo assoluto che i prodotti derivati da materiale umano non siano infettivi. Trattare tutti i materiali di origine umana come potenzialmente in grado di trasmettere infezioni, adottando le precauzioni universali. I donatori di materiale umano sono stati sottoposti anche a screening per la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ).

#### **CONTROINDICAZIONI**

Il prodotto contiene gentamicina solfato. Adottare le opportune precauzioni per assicurarsi che la paziente non presenti sensibilità a questo antibiotico.



## ESPAÑOL

**ADVERTENCIA PARA LA UE:** Para uso exclusivamente por parte de profesionales.

### USO PREVISTO

Vit Kit - Freeze NX se ha diseñado para su uso en procedimientos de reproducción asistida para la vitrificación y conservación de ovocitos humanos (MII), cigotos pronucleares (PN), embriones en el estadio de división del día 3 y embriones en el estadio de blastocisto.

### DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Equilibration NX-ES** es una solución doblemente tamponada (HEPES y MOPS) del medio Continuous Single Culture (CSCM) que contiene sulfato de gentamicina, 7,5 % (v/v) de DMSO y etilenglicol, respectivamente, y 20 % (v/v) de Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX-VS** es una solución doblemente tamponada (HEPES y MOPS) de CSCM que contiene sulfato de gentamicina, 15 % (v/v) de DMSO y etilenglicol, respectivamente, 20 % (v/v) de DSS y trehalosa 0,5 M.

**Washing NX-WS** es una solución doblemente tamponada (HEPES y MOPS) de CSCM que contiene sulfato de gentamicina y 20 % de DSS.

DSS es un suplemento proteico compuesto por 50 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) de calidad terapéutica y 20 mg/ml de dextrano. DSS se utiliza al 20 % (v/v) en Vit Kit - Freeze NX, es decir, con una concentración final de HSA de 10 mg/ml y de dextrano de 4 mg/ml.

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

### COMPOSICIÓN

#### Sales e iones

Fosfato potásico  
Cloruro sódico  
Cloruro potásico  
Sulfato de magnesio  
Cloruro cálcico

#### Aminoácidos

L-arginina  
Glicina  
L-histidina  
L-lisina  
L-prolina  
L-tirosina  
L-alanina  
Ácido L-aspártico  
L-asparagina  
Ácido L-glutámico  
L-isoleucina  
L-leucina  
L-alanil-L-glutamina  
L-metionina

L-fenilalanina  
L-serina  
L-treonina  
L-triptófano  
L-valina  
L-cisteína

#### Fuentes de energía

Dextrosa  
Piruvato sódico  
Lactato sódico

#### Sistemas tampón

Bicarbonato sódico  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidantes

Citrato de sodio  
EDTA

#### Proteína

Albumina sérica humana  
(HSA)

#### Crioprotectores

Dextrano  
Trehalosa  
Etilenglicol  
Dimetilsulfóxido

### CONTROL DE CALIDAD

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

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

- Endotoxinas, por el método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) ( $\leq 0,6$  UE/ml) conforme al ensayo 85 «Bacterial Endotoxins» de la USP y a la Ph. Eur. 2.6.14
- Ensayo de embriones de ratón (estadio de una célula) ( $\geq 80$  % de blastocistos expandidos)
- Esterilidad, por el ensayo 71 «Sterility Test» de la USP y la Ph. Eur. 3.2 (supera el ensayo)

Todos los resultados están descritos en el certificado de análisis específico de cada lote, el cual puede obtenerse previa petición.

### MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

- Dispositivo de vitrificación preferido
- Placas de Petri estériles (50 × 9 mm, Falcon 351006 o equivalente)
- Viales de congelación (4,5 ml) o copas y criocañías
- Hialuronidasa (n.º ref. 90101) para la vitrificación de ovocitos
- Guantes desechables
- Pipetas de transferencia (pipetas de vidrio estiradas o puntas de micropipeta con un diámetro interno de la punta de ~200  $\mu$ m)
- Pinzas
- Cronómetro o temporizador
- Depósito de nitrógeno líquido (vaso Dewar o de espuma de poliestireno con tapa, volumen 1-2 l)
- Nitrógeno líquido (volumen suficiente para llenar el depósito con una profundidad de 4 in)

### INSTRUCCIONES DE USO

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

- Equilibration NX-ES (ES):
  - 60  $\mu$ l para el protocolo de vitrificación de ovocitos
  - 0
  - 50  $\mu$ l para el protocolo de vitrificación de embriones

- Vitrificación NX-VS (VS):  
50 µl para cualquiera de los protocolos de vitrificación
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl para el protocolo de vitrificación de ovocitos

### PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN:

NOTA: Los procedimientos deben realizarse a temperatura ambiente (20-27 °C). NO utilice la platina caliente del microscopio en los procedimientos siguientes. PRECAUCIÓN: Minimice la exposición de la muestra a la luz durante el equilibrio en las soluciones ES y VS.

1. Lleve a temperatura ambiente (20-27 °C) la cantidad de ES, VS y WS que desee utilizar.

NOTA: Procure no llevar de forma reiterada a temperatura ambiente los viales enteros de ES, VS y WS cada vez que necesite una parte de la solución. Es preferible repartir en alícuotas la cantidad que se desee utilizar y volver a llevar los viales a 2-8 °C inmediatamente después. Washing NX (WS) se utiliza para la vitrificación de ovocitos.

2. Llene el depósito de nitrógeno líquido con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L) hasta una profundidad de 4 in o hasta la profundidad necesaria para sumergir todo el vial de congelación de la caña, y colóquelo cerca del microscopio. Introduzca un vial de congelación o copa (sin tapar) en el soporte inferior de una criocañá y súmérjalo en el nitrógeno líquido como paso previo a la conservación de las muestras vitrificadas.
3. Cuente el número de muestras que desee vitrificar.
4. Etiquete cada placa de Petri estéril (o tapa) y cada dispositivo de criocervación con la información necesaria.
5. Examine con cuidado el dispositivo de vitrificación antes de comenzar el procedimiento.
6. Invierta con suavidad cada vial de ES y VS para mezclar su contenido antes de usarlos.
7. Prepare la placa con gotas de las soluciones para el procedimiento de vitrificación de la siguiente manera:

#### A. Protocolo de vitrificación de OVOCITOS (MII):

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

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

1. Dispense de manera aséptica sendas gotas de 20 µl de WS, ES1 y ES2 (con proximidad entre ellas) y ES3 sobre una tapa invertida de una placa de Petri estéril según se muestra en la figura 1, y coloque la placa en la platina del microscopio:
  - una gota de 20 µl de WS
  - tres gotas de 20 µl (60 µl en total) de ES (ES1, ES2, ES3)

2. Retire de la incubadora la placa de cultivo que contiene los ovocitos MII y verifique la calidad de las muestras bajo el microscopio. Seleccione, si es posible, solo el ovocito u ovocitos óptimos de la etapa MII.

PRECAUCIÓN: Minimice la exposición a la luz de la(s) muestra(s) durante el equilibrio en las gotas de WS, ES.

3. Transfiera el ovocito (hasta 2 a la vez) con un volumen mínimo de medio de la placa de cultivo (en la incubadora) a la gota de 20 µl de WS durante un minuto.
4. Con la punta de la pipeta de transferencia, fusione la gota de WS con la de ES1 (véase la figura 1, flecha 1) y deje que se mezclen espontáneamente las dos soluciones durante 2 minutos.
5. Luego, fusione la gota de ES2 (flecha 2) con las gotas previamente fusionadas y deje que se mezclen durante 2 minutos.
6. Transfiera el ovocito u ovocitos que tengan un volumen mínimo de solución de la gota fusionada a la gota ES3 durante 6-10 minutos.

Nota: el equilibrio de los ovocitos en ES3 se completa cuando el espesor de la zona pelúcida se iguala con el del espacio perivitelino. El ovocito u ovocitos se sedimentarán de ordinario en el fondo de la gota en 3 minutos.

7. Durante el período de equilibrio en ES3, dispense de forma aséptica una (1) gota de 50 µl de VS antes de completar el equilibrio y prepare el dispositivo de vitrificación preferido para la carga (figura 2).

8. Los pasos siguientes (9-13) se completarán en 80-110 segundos.

PRECAUCIÓN: La exposición de las muestras a VS se limitará para evitar la citotoxicidad. La(s) muestra(s) tienden a flotar en el VS, así que enfoque el microscopio para visualizar la exposición en todo momento y acerque la punta de la pipeta de transferencia para facilitar una transferencia rápida entre gotas. Consulte la figura 2.

9. Enjuague y llene de inmediato la punta de la pipeta de transferencia con VS antes de que se complete el equilibrio en ES; extraiga la(s) muestra(s) con un volumen mínimo de ES en la punta de la pipeta y transfírela(s) a la gota de VS durante 50-60 segundos. Descargue los ovocitos al fondo de VS. Durante la descarga, los ovocitos flotarán hacia la parte superior de VS. Para asegurar un enjuague completo con VS, utilice una pipeta para desplazar de nuevo y con suavidad los ovocitos hasta el centro del fondo de VS.

Durante este proceso, los ovocitos se deshidratarán y volverán a flotar.

10. Cargue y selle el dispositivo de vitrificación siguiendo las instrucciones del fabricante.

11. Una vez vitrificada(s) la(s) muestra(s), en el dispositivo de vitrificación preferido, colóquela(s) en el vial de congelación o copa (en la criocañá) que habrá sumergido en el depósito de N<sub>2</sub>L (figura 3). Tape el vial de congelación (o copa) o inviértalo y conéctelo a otro vial de congelación destapado para que el dispositivo vitrificado permanezca dentro del nitrógeno líquido.

12. Acerque el depósito de N<sub>2</sub>L al criocongelador de N<sub>2</sub>L y transfiera la criocañá con su contenido al criocongelador para su conservación a largo plazo.

#### B. Protocolo de vitrificación DE EMBRIONES (de PN a blastocisto):

1. Dispense de manera aséptica una gota de 50 µl de ES en una tapa invertida de una placa de Petri (figura 4).
2. Retire de la incubadora la placa de cultivo con el embrión u embriones y verifique la calidad de la(s) muestra(s) bajo el microscopio. Seleccione, si es posible, solo el embrión u embriones óptimos para la vitrificación.
3. Transfiera con cuidado la muestra (hasta dos a la vez) con un volumen mínimo de medio desde la placa de cultivo hasta la gota de ES y ponga en marcha el temporizador.



Los embriones deben equilibrarse lentamente por caída libre en la gota de ES durante 6-10 minutos.

NOTA 1: La muestra se encogerá y luego recuperará poco a poco su tamaño original: esto indica que se ha alcanzado el equilibrio.

PRECAUCIÓN: Minimice la exposición a la luz de la(s) muestra(s) durante el equilibrio en las gotas de ES y VS.

4. Durante el periodo de equilibrio en ES, dispense de forma aseptica una gota de 50 µl de la solución VS como se muestra en la figura 4 y prepare el dispositivo de vitrificación preferido para la carga.
5. Enjuague y llene de inmediato la punta de la pipeta de transferencia con VS antes de que se alcance el equilibrio en ES; extraiga la(s) muestra(s) con un volumen mínimo de ES en la punta de la pipeta y transfírela(s) a la gota de VS durante al menos 30 segundos. Descargue los embriones al fondo de VS. Durante la descarga, los embriones flotarán hacia la parte superior de VS. Para asegurar un enjuague completo con VS, con una pipeta desplace de nuevo y con suavidad los embriones hasta la parte inferior central de VS.

NOTA 2: Durante este proceso, los embriones se deshidratarán y volverán a flotar.

6. Cargue y selle el dispositivo de vitrificación siguiendo las instrucciones del fabricante.
7. Coloque el dispositivo de vitrificación seguido en el vial de congelación o copa (en la criocañía) sumergidos en el depósito de N<sub>2</sub>L (figura 3). Tape el vial de congelación (o copa) o inviértalo y conéctelo a otro vial de congelación destapado para que el dispositivo vitrificado permanezca dentro del nitrógeno líquido.
8. Acerque el depósito de N<sub>2</sub>L al criocongelador de N<sub>2</sub>L y transfiera la criocañía con su contenido al criocongelador para su conservación a largo plazo.

Para más detalles sobre la utilización de estos productos, consultar los protocolos y los procedimientos de su propio laboratorio, que se habrán desarrollado y optimizado específicamente de acuerdo con su programa médico particular.

### **INSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**

Conserve los viales sin abrir en el frigorífico entre 2 y 8 °C. Si se conservan según las instrucciones, las soluciones Vit Kit - Freeze NX mantienen su estabilidad hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas de los viales.

Una vez abiertos los envases, no utilice los medios durante más de catorce (14) días.

Como el producto contiene material de origen humano, puede aparecer alguna partícula durante su conservación. Este tipo de partículas no tiene ningún efecto conocido en el rendimiento del producto.

### **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS**

Este producto está destinado a su uso por parte de personal con formación en procedimientos de reproducción asistida. Entre estos procedimientos se incluye la aplicación para la que se ha diseñado el dispositivo.

El centro donde se utilice este producto tiene la responsabilidad de mantener la trazabilidad del producto y debe cumplir la normativa nacional sobre trazabilidad, según corresponda.

No utilice ningún vial de solución con indicios de daños, fugas, partículas o turbidez. Desechar el producto de acuerdo con la reglamentación pertinente.

Para evitar problemas de contaminación, manipular con técnicas asepticas.

En la actualidad, la bibliografía empírica revela que se siguen desconociendo los efectos a largo plazo de la vitrificación sobre los ovocitos y los embriones.

No utilice frascos cuyo envase estéil esté dañado.

UE: entre las medidas estándar para la prevención de infecciones derivadas del uso de productos medicinales elaborados a partir de sangre y plasma humanos cabe mencionar, entre otras, la selección de donantes, la evaluación de donaciones individuales y de reservas de plasma para la identificación de marcadores específicos de infección y la inclusión de procedimientos de elaboración eficaces para la inactivación o eliminación de virus. A pesar de lo anterior, al administrar productos médicos elaborados a partir de sangre o plasma humanos, no se puede descartar por completo la posibilidad de transmisión de agentes infecciosos. Esta advertencia cabe aplicarla también a virus desconocidos o emergentes y a otros patógenos. No se ha informado de ninguna transmisión comprobada de virus con albúmina elaborada según las especificaciones de la Farmacopea Europea mediante procesos establecidos. Se recomienda encarecidamente que, cada vez que se administre a una paciente un medio de cultivo perteneciente a los productos para la reproducción de FUJIFILM Irvine Scientific, Inc., se registren el nombre y el número de lote del producto con la finalidad de conservar el nexo entre la paciente y el lote del producto.

EE.UU.: este producto contiene albúmina sérica humana (HSA). El material de origen humano utilizado en la preparación de este producto ha sido testado con kits aprobados por la FDA de EE. UU. y se ha determinado que dicho material no es reactivo a los anticuerpos de la hepatitis C (VHC) ni a los anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ningún método analítico ofrece garantías absolutas de que los productos de origen humano no sean infecciosos. Se aconseja manipular todos los materiales de origen humano como si fueran susceptibles de transmitir infecciones. Para ello, se deben tomar precauciones de carácter universal. Los donantes también fueron sometidos a análisis de detección de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

### **CONTRAINDICACIÓN**

El producto contiene sulfato de gentamicina. Es conveniente adoptar las medidas necesarias para asegurarse de que la paciente no sea sensible a este antibiótico.



## FRANÇAIS

**MISE EN GARDE (UE)** : réservé à un usage professionnel.

### UTILISATION PRÉVUE

Vit Kit-Freeze NX est destiné à être utilisé pour la vitrification et la conservation des ovocytes humains (MII), des zygotes pronucléaires (PN) jusqu'au troisième jour du stade de segmentation des embryons et du stade des blastocystes, lors des techniques de procréation médicalement assistée.

### DESCRIPTION DU DISPOSITIF

**Equilibration NX-ES** est une solution à double tampon (HEPES et MOPS) de Continuous Single Culture Medium (CSCM) contenant du sulfate de gentamicine, 7,5 % (v/v) de DMSO et d'éthylène glycol, et 20 % (v/v) de supplément de sérum dextrane (DSS).

**Vitrification NX-VS** est une solution à double tampon (HEPES et MOPS) de CSCM contenant du sulfate de gentamicine, 15 % (v/v) de DMSO et d'éthylène glycol, 20 % (v/v) de DSS et 0,5 M de tréhalose.

**Washing NX-WS** est une solution à double tampon (HEPES et MOPS) de CSCM contenant du sulfate de gentamicine et 20 % de DSS.

DSS est un supplément protéique constitué de 50 mg/ml d'albumine sérique humaine (HSA) de qualité thérapeutique et de 20 mg/ml de dextrane. DSS est utilisé à 20 % (v/v) dans le Vit Kit-Freeze NX avec une concentration finale de 10 mg/ml de HSA et 4 mg/ml de dextrane.

Ces solutions doivent être utilisées successivement selon le protocole de vitrification par micro-gouttelettes par étapes.

### COMPOSITION

#### Sels et ions

Phosphate de potassium  
Chlorure de sodium  
Chlorure de potassium  
Sulfate de magnésium  
Chlorure de calcium

#### Acides aminés

L-arginine  
Glycine  
L-histidine  
L-lysine  
L-proline  
L-tyrosine  
L-alanine  
Acide L-aspartique  
L-asparagine  
Acide L-glutamique  
L-isoleucine  
L-leucine  
L-alanyl-L-glutamine  
L-méthionine

L-phénylalanine  
L-sérine  
L-thréonine  
L-tryptophane  
L-valine  
L-cystine

#### Substrats énergétiques

Dextrose  
Pyruvate de sodium  
Lactate de sodium

#### Tampon

Bicarbonate de sodium  
HEPES  
MOPS

#### Antioxydants

Citrate de sodium  
EDTA

#### Protéine

Albumine sérique humaine,  
HSA

#### Cryoprotecteurs

Dextrose  
Tréhalose  
Éthylène Glycol  
Diméthylsulfoxyde

#### Antibiotique

Sulfate de gentamicine

### ASSURANCE QUALITÉ

Les solutions contenues dans le Vit Kit-Freeze NX sont stérilisées par filtration et manipulées de façon aseptique selon des procédés de fabrication qui ont été validés.

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

- Contenu en endotoxines par la méthode LAL ( $\leq 0,6$  EU/ml) par dosage des endotoxines bactériennes selon la pharmacopée américaine (USP) <85> et Ph. Eur. 2.6.14
- Test sur embryon de souris (une seule cellule) ( $\geq 80$  % du taux de blastocystes développés)
- Stérilité par les tests de stérilité courants de la pharmacopée américaine (USP) <71>, Ph. Eur. 3.2 (réussite)

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

### MATÉRIAUX REQUIS MAIS NON INCLUS

- Dispositif de vitrification choisi
- Boîtes de Pétri stériles (50 x 9 mm, Falcon 351006 ou modèle équivalent)
- Cryotubes (4,5 ml) ou gobelets et supports Cryocane
- Hyaluronidase (n° réf. 90101) pour la vitrification des ovocytes
- Gants jetables
- Pipettes de transfert (pipettes en verre tiré ou cônes de micropipette d'un diamètre intérieur de  $\sim 200$   $\mu$ m)
- Pincettes ou pinces
- Chronomètre ou minuterie
- Réservoir d'azote liquide (Dewar ou polystyrène avec couvercle, 1 à 2 l)
- Azote liquide (volume suffisant pour obtenir une profondeur de 4 po dans le réservoir)

### MODE D'EMPLOI

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

- Equilibration NX-ES (ES) :  
60  $\mu$ l pour le protocole de vitrification des ovocytes  
ou  
50  $\mu$ l pour le protocole de vitrification des embryons

- Vitrification NX-VS (VS) :  
50 µl pour les deux protocoles de vitrification
- Washing NX-WS (WS) :  
20 µl pour le protocole de vitrification des ovocytes

### PROTOCOLE DE VITRIFICATION :

REMARQUE : les interventions doivent se faire à température ambiante (entre 20 et 27 °C). NE PAS utiliser de platine de microscope chauffante pour les interventions suivantes. MISE EN GARDE : minimiser l'exposition des échantillons à la lumière pendant l'équilibrage dans les solutions ES et VS.

1. Mettre la quantité de solutions ES, VS et WS à utiliser à température ambiante (entre 20 et 27 °C).  
REMARQUE : éviter de mettre les flacons entiers de solutions ES, VS et WS à température ambiante à plusieurs reprises lorsqu'une portion de la solution est nécessaire pour chaque manipulation. Il est préférable de prélever la quantité à utiliser et de conserver les flacons entre 2 et 8 °C après l'aliquotage. La solution Washing NX (WS) est utilisée pour la vitrification des ovocytes.
2. Remplir le réservoir d'azote liquide (LN<sub>2</sub>) d'une quantité suffisante pour obtenir une profondeur de 4 po ou pour immerger complètement le cryotube sur la canne, et le placer à proximité du microscope. Raccorder un cryotube ou un gobelet (non fermé) au logement inférieur d'un support Cryocane et l'immerger dans l'azote liquide en préparation à la conservation des échantillons vitrifiés.
3. Déterminer le nombre d'échantillons à vitrifier.
4. Étiqueter chaque boîte de Pétri (ou couvercle) stérile, ainsi que le dispositif de conservation cryogénique en indiquant les informations nécessaires.
5. Examiner soigneusement le dispositif de vitrification avant de commencer l'intervention.
6. Retourner délicatement chaque flacon de solutions ES et VS pour mélanger le contenu avant l'utilisation.
7. Préparer la boîte en ajoutant des gouttelettes de solutions pour la vitrification, comme suit :

#### A. Protocole de vitrification des OVOCYTES (MII) :

REMARQUE 1 : les ovocytes récupérés sont dénudés avec de l'hyaluronidase pour confirmer qu'ils sont des MII.

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

1. Distribuer de façon aseptique une goutte de 20 µl de WS, ES1 et ES2 à proximité immédiate l'un de l'autre et de ES3 sur le couvercle retourné d'une boîte de Pétri stérile, comme illustré à la figure 1, puis placer la boîte sur la platine du microscope :
  - une goutte de 20 µl de WS
  - trois gouttes de 20 µl (60 µl au total) de ES (ES1, ES2, ES3)

2. Retirer la boîte de culture contenant les ovocytes MII de l'incubateur et vérifier la qualité des échantillons sous le microscope. Si possible, choisir seulement l'ovocyte/les ovocytes MII de qualité optimale.

MISE EN GARDE : minimiser l'exposition de l'échantillon/des échantillons à la lumière pendant l'équilibrage dans les gouttes WS, ES et VS.

3. Transférer les ovocytes (jusqu'à 2 à la fois) avec le volume minimal de milieu de la boîte de Pétri (dans l'incubateur) dans la goutte de 20 µl de WS pendant une minute.
4. Ajouter la goutte de WS à la solution ES1 (voir la figure 1, flèche 1) avec l'embout de la pipette de transfert et laisser les deux solutions se mélanger spontanément pendant 2 minutes.
5. Ajouter ensuite la goutte de ES2 (flèche 2) aux gouttes précédemment ajoutées et laisser reposer pendant 2 minutes.
6. Transférer l'ovocyte/les ovocytes avec le volume minimal de solution de la goutte ajoutée à la goutte de ES3 pendant 6 à 10 minutes.

Remarque : l'équilibrage de l'ovocyte/des ovocytes dans ES3 est terminé lorsque l'épaisseur de la zone pellucide est égale à celle de l'espace périvitellin. L'ovocyte/les ovocytes se déposent au fond de la goutte dans les 3 minutes en général.

7. Au cours de l'équilibrage dans la solution ES3, distribuer de façon aseptique une (1) goutte de 50 µl de VS avant la fin du processus et préparer le dispositif de vitrification choisi pour le chargement (figure 2).
8. Les étapes suivantes (9 à 13) doivent être terminées en 80 à 110 secondes.

MISE EN GARDE : l'exposition des échantillons à VS doit être limitée pour éviter la cytotoxicité. Le(s) échantillon(s) ont tendance à flotter dans VS. Ajuster le foyer du microscope pour maintenir une visualisation continue pendant l'exposition et conserver l'embout de la pipette de transfert à proximité pour assurer un transfert rapide entre les gouttes. Se reporter à la figure 2.

9. Rincer et remplir l'embout de la pipette de transfert avec VS immédiatement avant la fin de l'équilibrage dans ES, puis prélever le(s) échantillon(s) avec un volume minimal de ES dans l'embout de la pipette et transférer dans la goutte de VS pendant 50 à 60 secondes. Décharger les ovocytes au fond de la solution VS. Pendant ce processus, les ovocytes remonteront à la surface de VS. Pour assurer un rinçage complet avec VS, retourner délicatement les ovocytes au fond de la boîte de VS, en son centre, par pipetage.

Au cours du processus, les ovocytes seront déshydratés et remonteront à la surface.

10. Charger et fermer hermétiquement le dispositif de vitrification conformément aux instructions du fabricant.
11. Placer le(s) échantillon(s) vitrifié(s) sur le dispositif de vitrification choisi dans le cryotube ou le gobelet immergé rempli de LN<sub>2</sub> (sur le support Cryocane), figure 3. Fermer le cryotube (ou le gobelet) ou le retourner et le fixer à un autre cryotube non fermé pour assujettir le dispositif de vitrification dans l'azote liquide.
12. Rapprocher le réservoir de LN<sub>2</sub> du congélateur cryogénique LN<sub>2</sub> et transférer le support Cryocane ainsi que son contenu dans le congélateur cryogénique pour une conservation à long terme.

#### B. Protocole de vitrification des EMBRYONS (PN à blastocystes) :

1. Distribuer de façon aseptique une goutte de 50 µl de ES sur un couvercle inversé de boîte de Pétri (figure 4).
2. Retirer la boîte de culture contenant l'embryon/les embryons de l'incubateur et vérifier la qualité de l'échantillon/des échantillons sous le microscope. Si possible, choisir seulement l'embryon/les embryons de qualité optimale pour la vitrification.

3. Transférer délicatement les échantillons (jusqu'à deux à la fois) avec un volume minimal de milieu de la boîte de culture à la goutte de ES et démarrer la minuterie.  
Les embryons doivent s'équilibrer lentement dans la goutte ES en chute libre pendant 6 à 10 minutes.  
REMARQUE 1 : les échantillons rétréciront, puis reprendront leur taille initiale, indiquant que l'équilibrage est terminé.  
MISE EN GARDE : minimiser l'exposition de l'échantillon/des échantillons à la lumière pendant l'équilibrage dans les gouttes ES et VS.
4. Au cours de l'équilibrage dans ES, distribuer de façon aseptique une goutte de 50 µl de solution VS, comme indiqué à la figure 4 et préparer le dispositif de vitrification choisi pour le chargement.
5. Rincer et remplir l'embout de la pipette de transfert avec VS immédiatement avant la fin de l'équilibrage dans ES, puis prélever le(s) échantillon(s) avec un volume minimal de ES dans l'embout de la pipette et transférer dans la goutte de VS pendant au moins 30 secondes. Décharger les embryons au fond de la solution VS. Pendant ce processus, les embryons remonteront à la surface de VS. Pour assurer un rinçage complet avec VS, retourner délicatement les embryons au fond de la boîte de VS, en son centre, par pipetage.  
REMARQUE 2 : au cours du processus, les embryons seront déshydratés et remonteront à la surface.
6. Charger et fermer hermétiquement le dispositif de vitrification conformément aux instructions du fabricant.
7. Placer le dispositif de vitrification choisi dans le cryotube ou le gobelet immergé rempli de LN<sub>2</sub> (sur le support Cryocane), figure 3. Fermer le cryotube (ou le gobelet) ou le retourner et le fixer à un autre cryotube non fermé pour assujettir le dispositif de vitrification dans l'azote liquide.
8. Rapprocher le réservoir de LN<sub>2</sub> du congélateur cryogénique et transférer le support Cryocane ainsi que son contenu dans le congélateur cryogénique pour une conservation à long terme.

Pour plus de détails sur l'utilisation de ces produits, chaque laboratoire doit consulter ses propres procédures et protocoles standard qui ont été spécialement élaborés et optimisés pour chaque établissement médical particulier.

### CONSIGNES DE CONSERVATION ET STABILITÉ

Conserver les flacons non entamés réfrigérés entre 2 et 8 °C. Conservées comme indiqué ci-dessus, les solutions de Vit Kit-Freeze NX sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes des flacons.

Ne pas utiliser de milieux pendant plus de quatorze (14) jours une fois que les récipients sont ouverts.

Le produit contenant du matériel d'origine humaine, il peut produire des particules pendant le stockage. Ce type de particules n'aurait aucun effet sur les performances du produit.

### PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Ce dispositif est destiné à une utilisation par un personnel formé aux techniques de procréation médicalement assistée. Ces procédures incluent l'application indiquée pour laquelle ce dispositif est prévu.

L'établissement de l'utilisateur de ce dispositif est tenu de veiller à la traçabilité du produit et doit se conformer aux réglementations nationales en matière de traçabilité, le cas échéant.

Ne pas utiliser de flacon de solution s'il est détérioré, s'il présente des fuites, s'il contient des particules ou s'il est trouble. Jeter le produit conformément aux réglementations en vigueur.

Pour éviter les problèmes de contamination, manipuler en appliquant des techniques aseptiques.

Actuellement, la documentation de recherche indique que les effets à long terme de la vitrification sur les ovocytes et les embryons restent inconnus.

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

UE : les mesures standard pour éviter les infections résultant de l'utilisation de produits médicaux fabriqués à partir de sang ou de plasma humain incluent la sélection des donateurs, la recherche de marqueurs spécifiques d'infection sur les dons individuels et les mélanges de plasma et l'inclusion d'étapes de fabrication efficaces pour l'inactivation/l'élimination des virus. En dépit de ces mesures, lorsque des produits médicaux fabriqués à partir de sang ou de plasma humain sont administrés à un patient, la possibilité de transmission d'agents infectieux ne peut être totalement exclue. Cela s'applique également aux virus inconnus ou émergents et autres pathogènes. Aucun cas de transmission de virus n'a été signalé avec l'albumine fabriquée conformément aux spécifications de la pharmacopée européenne selon des procédés établis. Lors de chaque administration d'un milieu de culture pour la procréation de FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. à un patient, il est vivement recommandé d'enregistrer le nom et le numéro de lot du produit afin d'établir un lien entre le patient et le lot du produit.

USA : ce produit contient de l'albumine sérique humaine (HSA). Le matériel d'origine humaine utilisé dans la fabrication de ce produit a été testé par des kits approuvés par la FDA. Aucune réaction n'a été observée avec les anticorps du virus de l'hépatite C (VHC) ni avec ceux dirigés contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cependant, il n'y a pas de méthode d'analyse qui permette de garantir de façon absolue que les produits d'origine humaine ne sont pas contaminés. Manipuler tout matériel d'origine humaine comme s'il était susceptible de transmettre une infection en utilisant les précautions d'usage universelles. Les donateurs à l'origine de ce matériel ont tous subi un test de dépistage de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

### CONTRE-INDICATIONS

Le produit contient du sulfate de gentamicine. Des précautions particulières doivent être prises pour s'assurer que le patient ne présente aucune sensibilité à cet antibiotique.



## PORTUGUÊS

**ADVERTÊNCIA (UE):** apenas para uso profissional.

### UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Vit Kit - Freeze NX foi concebido para utilização em técnicas de reprodução assistida para vitrificação e conservação de oócitos (MI), zigotos pronucleares (PN) até ao 3.º dia do estágio de clivagem embrionária e embriões no estágio de blastocistos humanos.

### DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO

A **Equilibration NX-ES** é uma solução com dois sistemas tampão (HEPES e MOPS) de meio Continuous Single Culture (CSCM) com sulfato de gentamicina, DMSO e etilenoglicol a 7,5% (v/v) cada e suplemento de soro dextrano (DSS) a 20% (v/v).

A **Vitrification NX-VS** é uma solução com dois sistemas tampão (HEPES e MOPS) de CSCM com sulfato de gentamicina, DMSO e etileno glicol a 15% (v/v) cada, DSS a 20% (v/v) e Trealose 0,5 M.

A **Washing NX-WS** é uma solução com dois sistemas tampão (HEPES e MOPS) de CSCM com sulfato de gentamicina e DSS a 20%.

O DSS é um suplemento proteico composto por 50 mg/ml de albumina sérica humana (HSA) de categoria terapêutica e 20 mg/ml de dextrano. O DSS utiliza-se a 20% (v/v) no Vit Kit – Freeze NX para uma concentração final de 10 mg/ml de HSA e 4 mg/ml de dextrano.

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

### COMPOSIÇÃO

#### Sais e iões

Fosfato de potássio  
Cloreto de sódio  
Cloreto de potássio  
Sulfato de magnésio  
Cloreto de cálcio

#### Aminoácidos

L-arginina  
Glicina  
L-histidina  
L-lisina  
L-prolina  
L-tirosina  
L-alanina  
Ácido L-aspártico  
L-asparagina  
Ácido L-glutâmico  
L-isoleucina  
L-leucina  
L-alanil-L-glutamina  
L-metionina

#### L-fenilalanina

L-serina  
L-treonina  
L-triptofano  
L-valina  
L-cistina

#### Substratos energéticos

Dextrose  
Piruvato de sódio  
Lactato de sódio

#### Tampão

Bicarbonato de sódio  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidantes

Citrato de sódio  
EDTA

#### Proteína

Albumina sérica humana,  
HSA

#### Crioprotetores

Dextrano  
Trealose  
Etilenoglicol  
Dimetilsulfóxido

#### Antibióticos

Sulfato de gentamicina

### GARANTIA DE QUALIDADE

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

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

- Endotoxinas pelo ensaio de lisado de amebócitos de Limulus (LAL) ( $\leq 0,06$  UE/ml) por endotoxinas bacterianas de acordo com a USP <85> e Ph. Eur. 2.6.14
- Ensaio em embrião de ratinho (uma célula) ( $\geq 80\%$  blastocistos expandidos)
- Esterilidade pelo teste de esterilidade atual da USP <71>, Ph. Eur. 3.2 (aprovado)

Todos os resultados estão descritos no certificado de análise específico de cada lote, disponível a pedido.

### MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Dispositivo de vitrificação escolhido
- Placas de Petri estéreis (50 mm X 9 mm, Falcon 351006 ou equivalente)
- Criotubos (4,5 ml) ou taças e varetas de criopreservação
- Hialuronidase (ref.ª 90101) para vitrificação de oócitos
- Luvas descartáveis
- Pipetas de transferência (pipetas de vidro estirado ou pontas de micropipetas com um diâmetro interno na ponta de ~200 µm)
- Pinça de precisão ou prensão
- Cronómetro ou temporizador
- Reservatório de azoto líquido (Dewar ou recipiente de isopor com tampa, 1-2 l de volume)
- Azoto líquido (volume suficiente para ficar com cerca de 4 polegadas de profundidade no reservatório)

### INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60 µl para o protocolo de vitrificação de oócitos  
Ou  
50 µl para o protocolo de vitrificação de embriões

- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl para qualquer um dos protocolos de vitrificação
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl para o protocolo de vitrificação de oócitos

### PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO:

NOTA: Os procedimentos devem ser realizados à temperatura ambiente (20 °C-27 °C). NÃO aquecer a platina do microscópio para os seguintes procedimentos. CUIDADO: Reduzir ao mínimo a exposição do espécime à luz durante o equilíbrio nas soluções ES e VS.

1. Deixar a quantidade das soluções ES, VS e WS a utilizar atingir a temperatura ambiente (20 °C-27 °C).  
NOTA: Evitar levar tubos inteiros de ES, VS e WS à temperatura ambiente, repetidamente, quando for necessária apenas uma parte da solução de cada vez. É melhor dividir em alíquotas na quantidade a utilizar e repor os tubos a 2 °C-8 °C imediatamente após a divisão em alíquotas. A solução Washing NX (WS) utiliza-se para vitrificação de oócitos.
2. Deitar azoto líquido no respetivo reservatório (LN<sub>2</sub>) — suficiente para uma profundidade de cerca de 4 polegadas ou para mergulhar totalmente o criotubo na vareta - e colocar junto do microscópio. Fixar um criotubo ou uma taça (destapada) à braçadeira inferior de uma vareta de criopreservação e mergulhar no azoto líquido para preparar a conservação dos espécimes vitrificados.
3. Determinar o número de espécimes a vitrificar.
4. Identifique cada placa de Petri (ou tampa) estéril e o dispositivo de criopreservação com as informações necessárias.
5. Examinar minuciosamente o dispositivo de vitrificação antes de iniciar o procedimento.
6. Inverter cuidadosamente cada tubo de ES e VS para misturar o conteúdo antes de utilizar.
7. Preparar a placa com gotas das soluções para o processo de vitrificação, como indicado a seguir:

#### A. Protocolo de vitrificação de OÓCITOS (MII):

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

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

1. Dispensar assepticamente uma gota de 20 µl de WS, ES1 e ES2 (muito próximas) e ES3 na tampa invertida de uma placa de Petri estéril, como ilustrado na Figura 1, e colocar a placa na platina do microscópio:
  - uma gota de 20 µl de WS
  - três gotas de 20 µl (60 µl no total) de ES (ES1, ES2, ES3)
2. Retirar da incubadora a placa de cultura que contém os oócitos MII e verificar a qualidade dos espécimes ao microscópio. Quando possível, selecionar apenas oócitos na metáfase MII de melhor qualidade.  
CUIDADO: Reduzir ao mínimo a exposição do(s) espécime(s) à luz durante o equilíbrio nas gotas de WS, ES e VS.
3. Transferir os oócitos (até 2 de cada vez) com o mínimo de volume de meio da placa de cultura (na incubadora) para a gota de 20 µl de WS, durante um minuto.
4. Incorporar a gota de WS na de ES1 (Ver a Figura 1, seta 1) com a ponta da pipeta de transferência e deixar ocorrer a mistura espontânea das duas soluções durante 2 minutos.
5. Em seguida, incorporar a gota de ES2 (seta 2) nas gotas anteriormente fundidas e deixar durante 2 minutos.
6. Transferir o(s) oócito(s) com o mínimo de volume de solução da gota fundida para a gota de ES3 durante 6-10 minutos.  
Nota: o equilíbrio do(s) oócito(s) na solução ES3 é atingido quando a espessura da zona pelúcida e do espaço perivitelino for igual. O(s) oócito(s) assenta(m) no fundo da gota, tipicamente, dentro de 3 minutos.
7. Durante o tempo de equilíbrio na ES3, dispensar assepticamente uma (1) gota de 50 µl de VS, antes de atingido o equilíbrio, e preparar o dispositivo de vitrificação escolhido para o carregamento (Figura 2).
8. Os seguintes passos (9-13) devem ser realizados em 80-110 segundos.  
CUIDADO: A exposição dos espécimes à solução VS deve ser limitada para evitar a citotoxicidade. O(s) espécime(s) tende(m) a flutuar na solução VS, pelo que se deve corrigir a focagem através do microscópio, para manter a visualização contínua durante a exposição, e manter a ponta da pipeta de transferência na proximidade para garantir uma rápida transferência entre gotas. Ver a Figura 2.
9. Enxaguar e encher a ponta da pipeta de transferência com VS, imediatamente antes de atingido o equilíbrio na ES, aspirar o(s) espécime(s) com o mínimo de volume de ES para a ponta da pipeta e transferir para a gota de VS durante 50-60 segundos. Deslocar os oócitos para o fundo da VS. Durante a deslocação, os oócitos flutuam para o cimo da VS. Para garantir uma lavagem completa com VS, deslocar suavemente os oócitos de novo para o centro do fundo da VS, por pipetagem.  
Durante este processo, os oócitos ficam desidratados e voltam a flutuar.
10. Carregar e selar o dispositivo de vitrificação, de acordo com as instruções do fabricante.
11. Colocar o(s) espécime(s) vitrificado(s) no dispositivo de vitrificação escolhido dentro do criotubo ou taça (na vareta de criopreservação) cheios e mergulhados em LN<sub>2</sub> (Figura 3). Tapar o criotubo (ou taça) ou fixá-lo(a) em posição invertida com outro criotubo destapado para fixar o dispositivo vitrificado no azoto líquido.
12. Deslocar o reservatório de LN<sub>2</sub> para junto do congelador de criopreservação de LN<sub>2</sub> e transferir a vareta de criopreservação com o respetivo conteúdo para o congelador de criopreservação para conservação à longo prazo.

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

1. Dispensar assepticamente uma gota de 50 µl de ES na tampa invertida de uma placa de Petri (Figura 4).
2. Retirar da incubadora a placa de cultura que contém o(s) embrião(ões) e verificar a qualidade do(s) espécime(s) ao microscópio. Quando possível, selecionar apenas o(s) embrião(ões) de melhor qualidade para vitrificação.



3. Transferir cuidadosamente os espécimes (até dois de cada vez) com o mínimo de volume de meio da placa de cultura para a gota de ES e iniciar o temporizador.  
Os embriões devem equilibrar-se lentamente na gota de ES, por queda livre, durante 6-10 minutos.  
NOTA 1: O espécime encolhe e, depois, retoma gradualmente o tamanho original, o que indica que atingiu o equilíbrio.  
CUIDADO: Reduzir ao mínimo a exposição do(s) espécime(s) à luz durante o equilíbrio nas gotas de ES e VS.
4. Durante o tempo de equilíbrio na solução ES, dispensar assepticamente uma gota de 50 µl de solução VS, como ilustrado na Figura 4, e preparar o dispositivo de vitrificação escolhido para o carregamento.
5. Enxaguar e encher a ponta da pipeta de transferência com VS, imediatamente antes de atingido o equilíbrio na ES, aspirar o(s) espécime(s) com o mínimo de volume de ES para a ponta da pipeta e transferir para a gota de VS durante, pelo menos, 30 segundos. Deslocar os embriões para o fundo da VS. Durante a deslocação, os embriões flutuam para o cimo da VS. Para garantir uma lavagem completa com VS, deslocar suavemente os embriões de novo para o centro do fundo da VS por pipetagem.  
NOTA 2: Durante este processo, os embriões ficam desidratados e voltam a flutuar.
6. Carregar e selar o dispositivo de vitrificação, de acordo com as instruções do fabricante.
7. Colocar o dispositivo de vitrificação vitrificado escolhido dentro do criotubo ou taça (na vareta de criopreservação) cheios e mergulhados em LN<sub>2</sub> (Figura 3). Tapar o criotubo (ou taça) ou fixá-lo(a) em posição invertida com outro criotubo destapado para fixar o dispositivo vitrificado no azoto líquido.
8. Deslocar o reservatório de LN<sub>2</sub> para junto do congelador de criopreservação de LN<sub>2</sub> e transferir a vareta de criopreservação com o respetivo conteúdo para o congelador de criopreservação para conservação a longo prazo.

Para obter mais informações sobre a utilização destes produtos, cada laboratório deve consultar os respetivos procedimentos e protocolos que tenham sido concebidos e otimizados especificamente para o seu programa médico.

### **INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE**

Conservar os tubos por abrir refrigerados entre 2 °C e 8 °C. Quando conservadas de acordo com as instruções, as soluções do Vit Kit – Freeze NX são estáveis até à data de validade indicada nos rótulos dos tubos.

Não utilizar os meios além de catorze (14) dias após a abertura dos recipientes.

Como o produto contém material de origem humana, poderão desenvolver-se partículas durante a conservação. Não se conhecem efeitos destas partículas no desempenho do produto.

### **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS**

Este dispositivo foi concebido para ser utilizado por pessoal com formação em técnicas de reprodução assistida. Estas técnicas incluem a aplicação prevista para a qual este dispositivo foi concebido.

A instituição do utilizador deste dispositivo é responsável pela manutenção da rastreabilidade do produto e tem de cumprir a legislação nacional sobre rastreabilidade, sempre que aplicável.

Não utilizar nenhum tubo de solução que apresente evidências de danos, fugas, partículas ou turvação. Eliminar o produto de acordo com as regulamentações aplicáveis.

Para evitar problemas de contaminação, manipular o produto em condições de assepsia.

A literatura de investigação atual indica que não se conhecem os efeitos da vitrificação em óocitos e embriões a longo prazo.

Não utilizar nenhum frasco cuja embalagem estéril tenha sido comprometida.

UE: As medidas padrão para prevenir infeções resultantes da utilização de produtos medicamentosos preparados a partir de sangue ou plasma humano incluem a seleção de doadores, o rastreio de cada um dos produtos doados e de bancos de plasma para deteção de marcadores de infeção específicos, bem como a inclusão de etapas de fabrico eficazes para a inativação/eliminação de vírus. Não obstante estes cuidados, não é possível excluir totalmente a possibilidade de transmissão de agentes infecciosos quando se administram produtos medicinais preparados a partir de sangue ou plasma humano. Isto também se aplica a vírus desconhecidos ou emergentes, bem como a outros agentes patogénicos. Não há relatos que documentem a transmissão de vírus com albumina fabricada de acordo com as especificações da Farmacopeia Europeia através de processos comprovados. Recomenda-se vivamente que, sempre que produtos de meios reprodutivos da FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. sejam administrados a um doente, se registre o nome e o número de lote do produto, de modo a manter uma ligação entre cada doente e o lote do produto.

EUA: Este produto contém albumina sérica humana (HSA). Os materiais de origem humana usados no fabrico deste produto foram testados com kits aprovados pela FDA não sendo reativos aos anticorpos da hepatite C (VHC) e aos anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (VIH). No entanto, nenhum método de teste oferece garantia absoluta de que os produtos derivados de materiais de origem humana não sejam infecciosos. Manusear todos os materiais de origem humana como potencialmente passíveis de transmitir infeções, adotando precauções universais. Os doadores do material de origem também foram submetidos a testes para despiste da Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ).

### **CONTRAINDICAÇÕES**

O produto contém sulfato de gentamicina. Devem ser tomadas as precauções adequadas para assegurar que o doente não é sensível ao antibiótico.



## ΕΛΛΗΝΙΚΑ

**ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ Ε.Ε.:** Για επαγγελματική χρήση μόνο.

### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το Vit Kit - Freeze NX προορίζεται για χρήση σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για την υαλοποίηση και τη φύλαξη ανθρώπινων ωοκυττάρων (MII), προτυρηνικών (PN) ζυγωτών έως εμβρύων σε στάδιο σχάσης ημέρας 3 και εμβρύων σε στάδιο βλαστοκυττάρων.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Το **Equilibration NX-ES** είναι ένα διπλό ρυθμιστικό διάλυμα (HEPES και MOPS) μέσω Continuous Single Culture (CSCM) το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη, DMSO και αιθυλενογλυκόλη 7,5% (κ.ό.) από το καθένα και συμπλήρωμα ορού δεξτράνης (DSS) 20% (κ.ό.).

Το **Vitrification NX-VS** είναι ένα διπλό ρυθμιστικό διάλυμα (HEPES και MOPS) CSCM το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη, DMSO και αιθυλενογλυκόλη 15% (κ.ό.) από το καθένα, DSS 20% (κ.ό.) και 0,5 M τρεαλόζη.

Το **Washing NX-WS** είναι ένα διπλό ρυθμιστικό διάλυμα (HEPES και MOPS) CSCM το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη και DSS 20%.

Το DSS είναι ένα συμπλήρωμα πρωτεΐνης το οποίο περιέχει 50 mg/mL ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA) θεραπευτικού τύπου και 20 mg/mL δεξτράνης. Το DSS χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 20% (κ.ό.) στο Vit Kit - Freeze NX για επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 10 mg/mL HSA και 4 mg/mL δεξτράνης.

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

### ΣΥΝΘΕΣΗ

#### Άλατα και ιόντα

Φωσφορικό κάλιο  
Χλωριούχο νάτριο  
Χλωριούχο κάλιο  
Θειικό μαγνήσιο  
Χλωριούχο ασβέστιο

#### Αμινοξέα

L-Αργινίνη  
Γλυκίνη  
L-Ιστιδίνη  
L-Λυσίνη  
L-Προλίνη  
L-Τυροσίνη  
L-Αλανίνη  
L-Ασπαρτικό οξύ  
L-Ασπαραγίνη  
L-Γλουταμικό οξύ  
L-Ισολευκίνη  
L-Λευκίνη  
L-αλανυλο-L-γλουταμίνη  
L-Μεθειονίνη

L-Φαινυλαλανίνη  
L-Σερίνη  
L-Θρεονίνη  
L-Τρυπτοφάνη  
L-Βαλίνη  
L-Κυστίνη

#### Ενεργειακά υποκατάστατα

Δεξτρόζη  
Πυροσταφυλικό νάτριο  
Γαλακτικό νάτριο

#### Ρυθμιστικό διάλυμα

Διπτανθρακικό νάτριο  
HEPES  
MOPS

#### Αντιοξειδωτικά

Κιτρικό νάτριο  
EDTA

#### Πρωτεΐνη

Ανθρώπινη αλβουμίνη ορού,  
HSA

#### Κρυσταλλοστατευτικά υλικά

Δεξτράνη  
Τρεαλόζη  
Αιθυλενογλυκόλη  
Διμεθυλοσουλφοξείδιο

### ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

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

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

- Ενδοξίνη με τη μεθοδολογία προϊόντων λύσης αμοιβαδοειδών κυττάρων Limulus (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/mL) μέσω βακτηριακών ενδοτοξινών κατά USP <85> και Ph. Eur. 2.6.14
- Προσδιορισμό εμβρύου ποντικών (ενός κυττάρου) (σε διόγκωση της βλαστοκύστης  $\geq 80\%$ )
- Στερότητα μέσω της τρέχουσας δοκιμασίας στεριρότητας κατά USP <71>, Ph. Eur. 3.2 (Επιτυχής)

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

### ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ

- Συσκευή υαλοποίησης της επιλογής
- Στείρα τρυβλία petri (50 X 9 mm, Falcon 351006 ή ισοδύναμα)
- Κρυσσαλινάριο (4,5 mL) ή κρυσσαλίνης και κρυσράβδοι
- Υαλοουρονιδάση (Αρ. καταλόγου 90101) για την υαλοποίηση των ωοκυττάρων
- Αναλώσιμα γάντια
- Πιπέτες γενταφοράς (πιπέτες από γυαλί διαμορφωμένο με έλξη ή άκρα μικροπιπτετών με εσωτερική διάμετρο άκρου ~200  $\mu$ m)
- Λαβίδα
- Χρονόμετρο ή χρονοδιακόπτης
- Δεξαμενή υγρού αζώτου (δοχείο Ντιούαρ ή δοχείο από αφρό styrofoam με καπάκι, όγκου 1-2 L)
- Υγρό αζώτο [επαρκής όγκος για την επίτευξη βάθους 4 ιντσών στη δεξαμενή]

### ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ L για το πρωτόκολλο υαλοποίησης ωοκυττάρων  
H  
50  $\mu$ L για το πρωτόκολλο υαλοποίησης εμβρύων

- Vitrification NX-VS (VS):  
50 μL για το οποίοδηποτε πρωτόκολλο υαλοποίησης
- Washing NX-WS (WS):  
20 μL για το πρωτόκολλο υαλοποίησης ωκυττάρων

## ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗΣ:

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Οι διαδικασίες πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-27 °C). ΜΗ χρησιμοποιείτε μικροσκόπιο με θερμαινόμενη τράπεζα για τις ακόλουθες διαδικασίες. **ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ:** Περιορίστε στο ελάχιστο την έκθεση του δείγματος στο φως κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης στα διαλύματα ES και VS.

1. Φέρτε την ποσότητα των διαλυμάτων ES, VS και WS που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (20-27 °C).  
**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Αποφεύγετε να φέρνετε ολόκληρα τα φιαλίδια των διαλυμάτων ES, VS και WS σε θερμοκρασία δωματίου κάθε φορά που χρειάζεται κάποιο μέρος του διαλύματος. Είναι καλύτερο να γίνεται κλασματοποίηση της ποσότητας που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και να επανέρχονται τα φιαλίδια σε θερμοκρασία 2-8 °C αμέσως μετά την κλασματοποίηση. Το Washing NX (WS) χρησιμοποιείται για την υαλοποίηση των ωκυττάρων.
2. Πληρώστε τη δεξαμενή υγρού αζώτου με υγρό άζωτο (LN<sub>2</sub>), επαρκώς ώστε να επιτευχθεί βάθος 4 ιντσών ή για την πλήρη εμβύθιση του κρυσωληγνάριου που υπάρχει επάνω στη ράβδο, και τοποθετήστε κοντά στο μικροσκόπιο. Προσαρτήστε ένα κρυσωληγνάριο ή μια κρουοράβδο (χωρίς το πώμα) στον κάτω σφικκτήρα μιας κρουοράβδου και εμβύθιστε στο υγρό άζωτο, για την προετοιμασία των υαλοποιημένων δειγμάτων για φύλαξη.
3. Προσδιορίστε τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να υαλοποιηθούν.
4. Επιστημόνεται κάθε αποστειρωμένο τρυβλίο petri (ή κατάκι) και τη συσκευή φύλαξης κρυσωληγνάριας με τις απαραίτητες πληροφορίες.
5. Εξετάστε προσεκτικά τη συσκευή υαλοποίησης, πριν από την έναρξη της διαδικασίας.
6. Αναστρέψτε με ήπιες κινήσεις κάθε φιαλίδιο ES και VS για να αναμιχθούν τα περιεχόμενα, πριν από τη χρήση.
7. Προετοιμάστε το τρυβλίο με σταγόνες διαλυμάτων για τη διαδικασία υαλοποίησης, ως εξής:

### A. Πρωτόκολλο υαλοποίησης ΟΩΚΥΤΤΑΡΩΝ (MII):

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

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

1. Διανείμετε με άσηπτη τεχνική σταγόνες 20 μL από τα διαλύματα WS, ES1 και ES2 σε στενή εγγύτητα και από το διάλυμα ES3 σε ένα ανεστραμμένο κατάκι στειρού τρυβλίου petri, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 και τοποθετήστε το τρυβλίο στην τράπεζα του μικροσκοπίου:
  - μία σταγόνα 20 μL WS
  - τρεις σταγόνες 20 μL (60 μL συνολικά) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Απομακρύνετε το τρυβλίο καλλιέργειας που περιέχει τα ωκυττάρων MII από τον επωαστήρα και ελέγξτε την ποιότητα των δειγμάτων στο μικροσκόπιο. Όπου είναι δυνατόν, επιλέγετε μόνο το ή τα ωκυττάρων σταδίου MII της καλύτερης ποιότητας.  
**ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ:** Περιορίζετε στο ελάχιστο την έκθεση του ή των δειγμάτων στο φως κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης στις σταγόνες WS, ES και VS.
3. Μεταφέρετε τα ωκυττάρων (έως 2 κάθε φορά) με ελάχιστο όγκο μέσου από το τρυβλίο καλλιέργειας (στον επωαστήρα) στη σταγόνα 20 μL WS επί ένα λεπτό.
4. Αναμείξτε τη σταγόνα WS με τη σταγόνα ES1 (βλ. Εικόνα 1, βέλος 1) με το άκρο της πιπέτας μεταφοράς και επιτρέψτε να γίνει αυθόρμητη ανάμειξη των δύο διαλυμάτων, επί 2 λεπτά.
5. Στη συνέχεια, αναμείξτε τη σταγόνα ES2 (βέλος 2) με το μείγμα των προηγούμενων σταγόνων και αφήστε επί 2 λεπτά.
6. Μεταφέρετε το ή τα ωκυττάρων με ελάχιστο όγκο διαλύματος από την αναμειγμένη σταγόνα στη σταγόνα ES3 επί 6-10 λεπτά.  
**Σημείωση:** Η εξισορρόπηση του ή των ωκυττάρων στο ES3 ολοκληρώνεται όταν το πάχος της διαφανούς ζώνης και του περιελικτικού χώρου είναι ίσο. Το ή τα ωκυττάρων θα καθιζάνουν στον πυθμένα της σταγόνας συνήθως εντός 3 λεπτών.
7. Κατά τη διάρκεια του χρόνου εξισορρόπησης σε ES3, διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία (1) σταγόνα 50 μL VS πριν από την ολοκλήρωση της εξισορρόπησης και προετοιμάστε τη συσκευή υαλοποίησης επιλογής για τοποθέτηση (Εικόνα 2).
8. Τα ακόλουθα βήματα (9-13) θα πρέπει να ολοκληρωθούν εντός 80-110 δευτερολέπτων.  
**ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ:** Η έκθεση των δειγμάτων στο διάλυμα VS θα πρέπει να περιορίζεται, προκειμένου να αποτρέπεται η κυταροτοξικότητα. Το ή τα δείγματα τείνουν να επιπλέουν στο VS, οπότε ρυθμίστε την επίαση του μικροσκοπίου, ώστε να διατηρείτε συνεχώς εικόνα κατά τη διάρκεια της έκθεσης και διατηρήστε το άκρο της πιπέτας μεταφοράς κοντά, προκειμένου να εξασφαλιστεί η ταχεία μεταφορά μεταξύ σταγόνων. Ανατρέξτε στην Εικόνα 2.
9. Εκπλύστε και πληρώστε το άκρο της πιπέτας μεταφοράς με VS αμέσως πριν από την ολοκλήρωση της εξισορρόπησης στο ES και αναρροφήστε το ή τα δείγματα με ελάχιστο όγκο ES στο άκρο της πιπέτας και μεταφέρετε μέσα στη σταγόνα του VS επί 50-60 δευτερολέπτα. Μεταφέρετε τα ωκυττάρων στον πυθμένα του VS. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, τα ωκυττάρων θα επιπλεύσουν στο επάνω μέρος του VS. Για να διασφαλιστεί η πλήρης έκπλυση με VS, μεταφέρετε προσεκτικά τα ωκυττάρων πίσω στο κάτω και κεντρικό μέρος του VS, με πιπετάριασμα.  
Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα ωκυττάρων θα αφυδατωθούν και θα επιπλεύσουν και πάλι πίσω.
10. Εκτελέστε τοποθέτηση και σφραγίστε τη συσκευή υαλοποίησης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
11. Τοποθετήστε το ή τα υαλοποιημένα δείγματα στη συσκευή υαλοποίησης της επιλογής, μέσα στον εμβυθισμένο, πληρωμένο με LN<sub>2</sub> κρυσωληγνάριο ή την κρουοράβδο (επάνω στην κρουοράβδο), βλ. Εικόνα 3. Πωμάτιστε το κρυσωληγνάριο (ή την κρουοράβδο) ή προσάρηστε ανάποδα σε έναν άλλο μη πωματισμένο κρυσωληγνάριο, προκειμένου να στερεώσετε την υαλοποιημένη συσκευή μέσα στο υγρό άζωτο.
12. Μετακινήστε τη δεξαμενή LN<sub>2</sub> πλησιέστερα στον κρουοκαταψύκτη LN<sub>2</sub> και μεταφέρετε την κρουοράβδο με τα περιεχόμενα στον κρουοκαταψύκτη, για μακροχρόνια φύλαξη.

## **B. Πρωτόκολλο υαλοποίησης EMBRYΩΝ (PN σε βλαστοκύστη):**

1. Διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία σταγόνα 50 μL ES σε ένα ανεστραμμένο καπάκι ενός τρυβλίου Petri (Εικόνα 4).
2. Απομακρύνετε το τρυβλίο καλλιέργειας που περιέχει το ή τα έμβρυα από τον επωαστήρα και ελέγξτε την ποιότητα του ή των βιγμάτων στο μικροσκόπιο. Όπου είναι δυνατόν, επιλέγεται μόνο το ή τα έμβρυα της καλύτερης ποιότητας για υαλοποίηση.
3. Μεταφέρετε προσεκτικά το δείγμα (έως δύο κάθε φορά) με ελάχιστο όγκο μέσου από το τρυβλίο καλλιέργειας στη σταγόνα ES και εκκινήστε το χρονόμετρο.

Τα έμβρυα θα πρέπει να εξισορροπούνται στη σταγόνα ES αργά, με ελεύθερη πώση επί 6-10 λεπτά.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ 1:** Το δείγμα θα συρρικνωθεί και, στη συνέχεια, θα ανακτήσει σταδιακά το αρχικό του μέγεθος, πράγμα που υποδεικνύει ότι η εξισορρόπηση έχει ολοκληρωθεί.

**ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΟΧΗΣ:** Περιορίζετε στο ελάχιστο την έκθεση του ή των δειγμάτων στο φως κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης στις σταγόνες ES και VS.

4. Κατά τη διάρκεια του χρόνου εξισορρόπησης σε ES, διανείμετε με άσηπτη τεχνική μία σταγόνα 50 μL διαλύματος VS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 και προτοιμάστε τη συσκευή υαλοποίησης επιλογής για τοποθέτηση.
5. Εκπλύνετε και πλρώστε το άκρο της πιπέτας μεταφοράς με VS αμέσως πριν από την ολοκλήρωση της εξισορρόπησης στο ES και αναρροφήστε το ή τα δείγματα με ελάχιστο όγκο ES στο άκρο της πιπέτας και μεταφέρετε μέσα στη σταγόνα του VS επί τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα. Μεταφέρετε τα έμβρυα στον πυθμένα του VS. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, τα έμβρυα θα επιπλεύσουν στο επάνω μέρος του VS. Για να διασφαλιστεί η πλήρης έκπλυση με VS, μεταφέρετε προσεκτικά τα έμβρυα πίσω στο κάτω και κεντρικό μέρος του VS, με πιπετάριασμα.
6. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ 2:** Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα έμβρυα θα αφυδατωθούν και θα επιπλεύσουν και πάλι πίσω.
6. Εκτέλεστε τοποθέτηση και σφραγίστε τη συσκευή υαλοποίησης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
7. Τοποθετήστε τη συσκευή υαλοποίησης της επιλογής μέσα στο εμβυσισμένο, πληρωμένο με LN<sub>2</sub>, κρουσωληνάριο ή την κρουοράβδο (επίανω στην κρουοράβδο) – Εικόνα 3. Πωματίστε το κρουσωληνάριο (ή την κρουοράβδο) ή προσάρτηστε ανάποδα σε έναν άλλο μη πωματισμένο κρουσωληνάριο, προκειμένου να στερεώσετε την υαλοποιημένη συσκευή μέσα στο υγρό άζωτο.
8. Μετακινήστε τη δεξαμενή LN<sub>2</sub> πλησιέστερα στον κρουοκαταψύκτη LN<sub>2</sub> και μεταφέρετε την κρουοράβδο με τα περιεχόμενα στον κρουοκαταψύκτη, για μακροχρόνια φύλαξη.

Για πρόσθετες λεπτομέρειες σχετικά με τη χρήση των προϊόντων αυτών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να συμβουλευτεί τις δικές του εργαστηριακές διαδικασίες και πρωτόκολλα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί και βελτιστοποιηθεί ειδικά για το δικό του ιατρικό πρόγραμμα.

### **ΟΔΗΓΙΕΣ ΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**

Φυλάσσετε τα κλειστά φιαλίδια στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C. Όταν φυλάσσονται σύμφωνα με τις οδηγίες, τα Διαλύματα Vit Kit – Freeze NX παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες των φιαλιδίων.

Μη χρησιμοποιείτε τα μέσα επί περισσότερες από δεκατέσσερις (14) ημέρες, αφού ανοιχθούν οι περιέκτες.

Καθώς υπάρχει υλικό ανθρώπινης προέλευσης στο προϊόν, μπορεί να αναπτυχθεί κάποια ποσότητα σωματιδιακής ύλης κατά τη διάρκεια της φύλαξης. Αυτό το είδος σωματιδιακής ύλης δεν είναι γνωστό να έχει επίδραση στην απόδοση του προϊόντος.

### **ΠΡΟΦΥΛΑΞΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΙΣ**

Η συσκευή αυτή προορίζεται για χρήση από προσωπικό εκπαιδευμένο στις διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την υποδεικνυόμενη εφαρμογή για την οποία προορίζεται η συσκευή αυτή.

Η εγκατάσταση όπου θα χρησιμοποιηθεί αυτή η συσκευή είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ιχνηλασιμότητας του προϊόντος και πρέπει να συμμορφώνεται με τους εθνικούς κανονισμούς που αφορούν την ιχνηλασιμότητα, όπου εφαρμόζεται.

Μη χρησιμοποιείτε οποιοδήποτε φιαλίδιο διαλύματος που παρουσιάζει ενδείξεις ζημιάς, διαρροής, σωματιδιακής ύλης ή θολερότητας. Απορρίψτε το προϊόν σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.

Για να αποφύγετε προβλήματα με μόλυνση, χειριστείτε εφαρμόζοντας άσηπτες τεχνικές.

Επί του παρόντος, η ερευνητική βιβλιογραφία καταδεικνύει ότι οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της υαλοποίησης στα ωοκύτταρα και στα έμβρυα παραμένουν άγνωστες.

Μη χρησιμοποιείτε καμία φιάλη στην οποία έχει παραβιαστεί η ακεραιότητα της αστείρευμένης συσκευασίας.

**E.E.:** Εφαρμόζονται τα τυπικά μέτρα πρόληψης λοιμώξεων από τη χρήση φαρμακευτικών προϊόντων που έχουν παρασκευαστεί από ανθρώπινο αίμα ή πλάσμα και περιλαμβάνουν την επιλογή των δοτών, τη διαλογή μεμονωμένων δωρεών και τη δημιουργία δεξαμενών πλάσματος για συγκεκριμένους δείκτες λοίμωξης, καθώς και τη συμπερίληψη αποτελεσματικών βημάτων κατά την παρασκευή για την αδρανικοποίηση/αφαίρεση των ιών. Παρόλα αυτά, όταν χορηγούνται φαρμακευτικά προϊόντα που έχουν παρασκευαστεί από ανθρώπινο αίμα ή πλάσμα, δεν είναι δυνατόν να αποκλειστεί εντελώς η πιθανότητα μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων. Αυτό ισχύει επίσης και για άγνωστους ή νοσημονιζόμενους ιούς και άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Δεν υπάρχουν αναφορές αποδεδειγμένης μετάδοσης ιών με αλβουμίνη η οποία έχει παρασκευαστεί με τις προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, μέσω των καθιερωμένων διαδικασιών. Συνιστάται ιδιαίτερος, κάθε φορά που χορηγούνται μέσα καλλιέργειας προϊόντων και μέσα αναπαραγωγής της FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. σε έναν ασθενή, να καταγράφεται το όνομα και ο αριθμός παρτίδας του προϊόντος, ώστε να διατηρείται ένας σύνδεσμος μεταξύ του ασθενούς και της παρτίδας του προϊόντος.

Η.Π.Α.: Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA). Το υλικό ανθρώπινης προέλευσης το οποίο χρησιμοποιείται στην παρασκευή του προϊόντος αυτού έχει ελεγχθεί με εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) κιτ και έχει βρεθεί ότι δεν αντιδρά σε αντισώματα κατά του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) και σε αντισώματα κατά του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Ωστόσο, καμία μέθοδος ελέγχου δεν προσφέρει πλήρη διασφάλιση ότι τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης δεν είναι μολυσματικά. Ο χειρισμός όλων των υλικών ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να γίνεται σαν να είναι δυνατό να μεταδώσουν λοίμωξη, εφαρμόζοντας γενικές προφυλάξεις. Οι δότες του αρχικού υλικού έχουν επίσης εξεταστεί για νόσο Creutzfeldt-Jakob (CJD).

**ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΗ**

Το προϊόν περιέχει θειική γενταμυκίνη. Θα πρέπει να λαμβάνονται οι απαραίτητες προφυλάξεις για να διασφαλιστεί ότι ο ασθενής δεν έχει ευαισθησία στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

# ČEŠTINA

**UPOZORNĚNÍ PRO EU:** Pouze pro profesionální použití.

## URČENÉ POUŽITÍ

Souprava Vit Kit - Freeze NX je určena pro postupy asistované reprodukce k vitifikaci a uchování lidských oocytů (MII), pronukleárních (PN) zygot do úrovně embrya ve stádiu rýhování 3. dne a embryí ve stádiu blastocysty.

## POPIS PROSTŘEDKU

**Equilibration NX-ES** je dvojitě pufovaný roztok (HEPES a MOPS) kultivačního média Continuous Single Culture (CSCM) obsahující gentamicin-sulfát, 7,5 % (v/v) DMSO i ethylenglykolu a 20 % (v/v) sérového doplňku na bázi dextransu (Dextran Serum Supplement, DSS).

**Vitification NX-VS** je dvojitě pufovaný roztok (HEPES a MOPS) CSCM obsahující gentamicin-sulfát, 15 % (v/v) DMSO i ethylenglykolu, 20 % (v/v) DSS a 0,5 M trehalózy.

**Washing NX-WS** je dvojitě pufovaný roztok (HEPES a MOPS) CSCM obsahující gentamicin-sulfát a 20 % (v/v) DSS.

DSS je přípravek k suplementaci proteinů a sestává z 50 mg/ml lidského sérového albuminu (HSA) terapeutické kvality a 20 mg/ml dextransu. DSS se v soupravě Vit Kit – Freeze NX používá při 20 % (v/v) k dosažení konečné koncentrace 10 mg/ml HSA a 4 mg/ml dextransu.

Tyto roztoky se používají v pořadí podle kroků protokolu vitifikace mikroapek.

## SLOŽENÍ

### Soli a ionty

Fosforečnan draselný  
Chlorid sodný  
Chlorid draselný  
Síran hořečnatý  
Chlorid vápenatý

### Aminokyseliny

L-arginin  
Glycin  
L-histidin  
L-lysin  
L-prolin  
L-tyrosin  
L-alanin  
L-kyselina asparagová  
L-asparagin  
L-kyselina glutamová  
L-isoleucin  
L-leucin  
L-alanyl-L- glutamin  
L-methionin

L-fenylalanin  
L-serin  
L-threonin  
L-tryptofan  
L-valin  
L-cystin

### Energetické substráty

Dextróza  
Pyruvát sodný  
Mléčnan sodný

### Pufr

Hydrogenuhličitan sodný  
HEPES  
MOPS

### Antioxidanty

Citronan sodný  
EDTA

### Protein

Lidský sérový albumin, HSA

### Kryoprotektanty

Dextran  
Trehalóza  
Ethylenglykol  
Dimethylsulfoxid

### Antibiotika

Gentamicin-sulfát

## ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

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

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

- na endotoxiny testem Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/ml) podle lékopisu USA Bacterial Endotoxins <85> a Ph. Eur. 2.6.14
- test na myších embryích (jednoubuněčné při  $\geq 80$  % expandované blastocystě)
- na sterilitu aktuálně používaným testem na kontrolu sterility podle lékopisu USA <71>, Ph. Eur. 3.2 (úspěch)

Všechny výsledky jsou uvedeny v analytickém certifikátu k příslušné šarži, který je k dispozici na vyžádání.

## POTŘEBNÉ NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Vitřifikační prostředek vlastní volby
- Sterilní Petriho misky (50 x 9 mm, Falcon 351006 nebo ekvivalentní)
- Kryozkumavky (4,5 ml) nebo zásobníky a držáky
- Hyaluronidázu (kat. č. 90101) k vitřifikaci oocytů
- Jednorázové rukavice
- Transferové pipety (skleněné pipety z taženého skla nebo mikropipetové hroty s vnitřním průměrem hrotu ~200  $\mu$ m)
- Pinzeta nebo kleště
- Stopky nebo časovač
- Nádoba na kapalný dusík (Dewarova nádoba nebo nádoba z pěnového polystyrenu s víkem, objem 1–2 l)
- Kapalný dusík (objem postačující k dosažení hloubky 4 palců v nádobě)

## NÁVOD K POUŽITÍ

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l pro protokol vitřifikace oocytů  
nebo  
50  $\mu$ l pro protokol vitřifikace embryí
- Vitřification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ l pro libovolný protokol vitřifikace
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ l pro protokol vitřifikace oocytů

## PROTOKOL VITRIFIKACE:

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

1. Nechte množství ES a VS, které má být použito, dosáhnout pokojové teploty (20–27 °C).

POZNÁMKA: Nenechte celé lahvičky ES, VS a WS opakovaně zahřívat na pokojovou teplotu, pokud budete potřebovat vždy jen část těchto roztoků. Lepší je odměřit množství, které se má použít, a lahvičky po odměření ihned vrátit do prostoru o teplotě 2–8 °C. Washing NX (WS) se používá k vitrifikaci oocytů.

2. Naplňte nádobu na kapalný dusík kapalným dusíkem (LN<sub>2</sub>) – použijte objem postačující k dosažení hloubky 4 palců nebo k úplnému ponoření kryozkumavky nebo držáku – a umístěte do blízkosti mikroskopu. Připevňte kryozkumavku nebo zásobník (neuzavřené víčkem) ke spodní svorce držáku a ponořte do kapalného dusíku, abyste je připravili k uložení vitrifikovaných vzorků.
3. Stanovte počet vzorků k vitrifikaci.
4. Vyznačte nezbytné informace na štítku každé Petriho misky (nebo víčka) a prostředku ke kryochování.
5. Před zahájením postupu pečlivě prohleďte vitrifikační prostředek.
6. Opatrným převrácením před použitím promíchejte obsah každé lahvičky ES a VS.
7. Postup přípravy misky s kapičkami roztoků pro vitrifikaci:

### A. Protokol vitrifikace OOCYTŮ (MI):

POZNÁMKA 1: Odebrané oocytů se denudují hyaluronidázou, aby se potvrdilo, že jsou MI.

POZNÁMKA 2: Protokol vitrifikace embryí naleznete v části B.

1. Asepticky nadávkujte 20 μl kapky WS, ES1 a ES2 (v těsné vzájemné blízkosti) a ES3 na obrácené víčko sterilní Petriho misky podle ilustrace na obr. 1 a misku umístěte na stolek mikroskopu:
  - jedna 20 μl kapka WS
  - tři 20 μl kapky (celkem 60 μl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Vyměte kultivační misku s MI oocytů z inkubátoru a zkontrolujte kvalitu vzorků pod mikroskopem. Pokud je to možné, vybírejte pouze nejvyšší fáze MI.  
POZOR: Při ekvilibraci v kapkách WS, ES a VS minimalizujte expozici vzorku (vzorků) světlu.
3. Přeneste oocyt (až 2 najednou) s minimálním objemem média z kultivační misky (v inkubátoru) na jednu minutu do 20 μl kapky WS.
4. Hrotem transferové pipety připojte kapku WS do ES1 (viz obr. 1, šipka 1) a nechte oba roztoky spontánně promíchávat po dobu 2 minut.
5. Potom připojte kapku ES2 (šipka 2) ke dříve spojeným kapkám a ponechte 2 minuty.
6. Přeneste oocyt(y) s minimálním objemem roztoku ze spojené kapky do kapky ES3 na dobu 6–10 minut.  
Poznámka: ekvilibrace oocytů (oocytů) v ES3 je dokončena, když zona pellucida a perivitellinální prostor mají stejnou tloušťku. Oocyt(y) se usadí na dně kapky obvykle do 3 minut.
7. Během doby ekvilibrace v ES3 asepticky nadávkujte jednu (1) 50 μl kapku VS před dokončením ekvilibrace a připravte vitrifikační prostředek vlastní volby k založení (obr. 2).
8. Následující kroky (9–13) je třeba provést za 80–110 sekund.  
POZOR: V zájmu prevence cytotoxicity je třeba omezit expozici vzorků VS. Vzorky mají tendenci ve VS plavat, proto zaostřete mikroskop, abyste je mohli nepřetržitě sledovat během expozice, a udržujte hrot transferové pipety v jejich blízkosti, abyste zajistili rychlý přenos mezi kapkami. Viz obr. 2.
9. Bezprostředně před dokončením ekvilibrace v ES opláchněte a naplňte hrot transferové pipety roztokem VS, natáhněte vzorek (vzorky) s minimálním objemem ES do hrotu pipety a na 50–60 sekund přeneste do kapky VS. Oocytů vypusťte na dno VS. Oocytů vyplují při vypuštění k povrchu VS. Abyste zajistili úplné opláchnutí roztokem VS, šetrně oocytů pipetováním znovu posuňte ke středu dna VS.  
Při tomto postupu budou oocytů dehydrované a vyplují znovu nahoru.
10. Založte do vitrifikačního prostředku a uzavřete podle pokynů výrobce.
11. Vložte vitrifikovaný vzorek (vzorky) na vitrifikačním prostředku vlastní volby do ponořené, LN<sub>2</sub> vyplněné kryozkumavky nebo zásobníku (na držáku). Viz obr. 3. Uzavřete kryozkumavku (nebo zásobník) víčkem nebo připojte v převrácené poloze k jiné víčkem neuzavřené kryozkumavce, aby vitrifikovaný prostředek byl zajištěn v kapalném dusíku.
12. Přesuňte nádobu s LN<sub>2</sub> do blízkosti kryomrazničky s LN<sub>2</sub> a přeneste držák s obsahem do kryokontejneru k dlouhodobému skladování.

### B. Protokol vitrifikace EMBRYÍ (PN až blastocysta):

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



5. Bezprostředně před dokončením ekvibrace v ES opláchněte a naplňte hrot transferové pipety roztokem VS, natáhněte vzorek (vzorky) s minimálním objemem ES do hrotu pipety a na nejméně 30 sekund přeneste do kapky VS. Embrya vypusťte na dno VS. Embrya vyplují při vypuštění k povrchu VS. Abyste zajistili úplné opláchnutí roztokem VS, šetrně embrya pipetováním znovu posuňte ke středu dna VS.
6. POZNÁMKA 2: Při tomto postupu budou embrya dehydrovaná a vyplují znovu nahoru.
6. Založte do vitrifikačního prostředku a uzavřete podle pokynů výrobce.
7. Vložte vitrifikovaný vitrifikační prostředek vlastní volby do ponořené, LN<sub>2</sub> vyplněné kryozkumavky nebo zásobníku (na držáku) – viz obr. 3. Uzavřete kryozkumavku (nebo zásobník) víčkem nebo připojte v převrácené poloze k jiné víčkem neuzavřené kryozkumavce, aby vitrifikovaný prostředek byl zajištěn v kapalném dusíku.
8. Přesuňte nádobu s LN<sub>2</sub> do blízkosti kryomrazničky s LN<sub>2</sub> a přeneste držák s obsahem do kryokontejneru k dlouhodobému skladování.

Další informace o použití těchto výrobků každá laboratoř získá ve vlastních laboratorních metodách a protokolech vypracovaných a optimalizovaných specificky pro její konkrétní zdravotnický program.

### POKYNY PRO UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Neotevřené lahvičky uchovávejte v chladničce při teplotě od 2 °C do 8 °C. Při doporučeném skladování jsou roztoky soupravy Vít Kit – Freeze NX stabilní do dat expirace uvedených na štítcích lahviček.

Média po otevření nádobek nepoužívejte déle než čtrnáct (14) dní.

Jelikož výrobek obsahuje lidský zdrojový materiál, mohou se v něm při skladování objevit částice. Není známo, že by tento typ částic měl vliv na funkci výrobku.

### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

Tento prostředek je určen k použití pracovníky školenými v postupech asistované reprodukce. Tyto postupy zahrnují použití, k němuž je tento prostředek určen.

Za sledovatelnost prostředku a dodržování platných státních předpisů týkajících se sledovatelnosti odpovídá podle situace zdravotnické zařízení, v němž je prostředek používán.

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

Abyste se zabránilo problémům s kontaminací, dodržujte při manipulaci aseptické postupy.

Odborná literatura aktuálně uvádí, že dlouhodobé účinky vitrifikace na oocyty a embrya nejsou dosud známé.

Nepoužívejte žádnou lahev s poškozeným sterilním balením.

EU: Standardní opatření k prevenci infekcí následkem používání léčivých přípravků získávaných z lidské krve nebo plazmy zahrnují výběr dárců, screening jednotlivých darovaných produktů a sdružené plazmy na přítomnost specifických markerů infekcí a zařazení účinných kroků k inaktivaci/odstranění virů do výrobního postupu. Navzdory tomu nelze možnost přenosu infekčních činitelů u léčivých přípravků získávaných z lidské krve nebo plazmy zcela vyloučit. To se také týká neznámých či nově objevených virů a jiných patogenů. U albuminu vyráběného zavedenými postupy podle specifikací Evropského lékopisu nebyly hlášeny žádné případy prokázaného přenosu virů. Pokaždé, když je pacientce podáno kulturační médium ze sortimentu reprodukčních médií FUJIFILM Irvine Scientific, Inc., důrazně doporučujeme zapsat jeho název a číslo šarže, aby byla zachována souvztažnost mezi pacientkou a šarží přípravku.

USA: Tento výrobek obsahuje lidský sérový albumin (HSA). Lidský zdrojový materiál použitý k přípravě tohoto výrobku byl testován soupravami schválenými FDA a shledán nereaktivním vůči protilátkám proti viru hepatitidy C (HCV) a viru lidské imunodeficiency (HIV). Žádná zkušební metoda však nemůže zcela zaručit, že přípravky získávané z lidských zdrojů nejsou infekční. Proto se všemi materiály z lidských zdrojů zacházejte, jako by u nich byla možnost přenosu infekce, a zachovávejte obvyklá preventivní opatření. Dárci zdrojového materiálu také prošli screeningem na Creutzfeldt-Jakobovu nemoc.

### KONTRAINDIKACE

Výrobek obsahuje gentamicin-sulfát. Vhodným preventivním postupem ověřte, že pacientka není senzitivní na toto antibiotikum.



## DANSK

**REGEL FOR EU:** Kun til professionel brug.

### ANVENDELSE

Vit Kit - Freeze NX er beregnet til brug i assisteret reproduktionsprocedurer til vitrificering og opbevaring af humane oocytter (MI), pronukleære (PN) zygoter til tredje dags embryoner på spaltningstadiet og embryoner på blastocyststadiet.

### BESKRIVELSE AF PRODUKTET

**Equilibration NX-ES** er en dobbeltbufferet opløsning (HEPES og MOPS) af Continuous Single Culture medium (CSCM) indeholdende gentamicinsulfat, 7,5 % (v/v) af hvert DMSO og ethylenglycol og 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitricification NX-VS** er en dobbeltbufferet opløsning (HEPES og MOPS) af CSCM indeholdende gentamicinsulfat, 15 % (v/v) af hvert DMSO og ethylenglycol, 20 % (v/v) DSS og 0,5 M trehalose.

**Washing NX-WS** er en dobbeltbufferet opløsning (HEPES og MOPS) af CSCM indeholdende gentamicinsulfat og 20 % DSS.

DSS er et proteinsupplement bestående af 50 mg/ml humant serumalbumin (HSA) af behandlingsmæssig kvalitet og 20 mg/ml dextran. DSS anvendes ved 20 % (v/v) i Vit Kit - Freeze NX for at få en endelig koncentration på 10 mg/ml HSA og 4 mg/ml dextran.

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

### SAMMENSÆTNING

#### Salte og ioner

Kaliumfosfat  
Natriumklorid  
Kaliumklorid  
Magnesiumsulfat  
Calciumklorid

#### Aminosyrer

L-arginin  
Glycin  
L-histidin  
L-lysin  
L-prolin  
L-tyrosin  
L-alanin  
L-asparaginsyre  
L-asparagin  
L-glutaminsyre  
L-isoleucin  
L-leucin  
L-alanyl-L-glutamin  
L-methionin

L-phenylalanin  
L-serin  
L-threonin  
L-tryptophan  
L-valin  
L-cystin

#### Energisubstrater

Glukose  
Natriumpyruvat  
Natriumlaktat

#### Buffer

Natriumbikarbonat  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidanter

Natriumcitrat  
EDTA

#### Protein

Humant serumalbumin, HSA

#### Kryoprotektanter

Dextran  
Trehalose  
Ethylenglycol  
Dimethylsulfoxid

#### Antibiotikum

Gentamicinsulfat

### KVALITETSSIKRING

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

Hvert parti Vit Kit - Freeze NX undergår følgende test:

- Endotoxin med Limulus Amebocyte Lysate-metoden (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/ml) med USP-bakterieendotoxiner <85> og Ph. Eur. 2.6.14
- Analyse af museembryo (éncellet) (ved  $\geq 80$  % ekspanderet blastocyst)
- Sterilitet med den aktuelle USP-sterilitetstest <71>, Ph. Eur. 3.2 (bestået)

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

### NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

- Det ønskede vitrificeringsprodukt
- Sterile petriskåle (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller tilsvarende)
- Kryorør (4,5 ml) eller bægre og kryoholdere
- Hyaluronidase (katalognr. 90101) til vitrificering af oocytter
- Engangshandsker
- Transferpipetter (glaspipetter af trukket glas eller mikropipettespidser med en indvendig diameter i spidsen på ~200  $\mu$ m)
- Pincet eller tang
- Stopur eller timer
- Beholder til flydende nitrogen (Dewar- eller Styrofoam-beholder med låg, 1-2 l volumen)
- Flydende nitrogen (tilstrækkelig volumen til at opnå en dybde på 4 tommer i beholderen)

### BRUGSANVISNING

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l til protokol for vitrificering af oocytter  
eller  
50  $\mu$ l til protokol for vitrificering af embryoner
- Vitricification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ l til begge vitrificeringsprotokoller
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ l til protokol for vitrificering af oocytter

## VITRIFICERINGSPROTOKOL

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

1. Bring den mængde ES, VS og WS, der skal anvendes, til stuetemperatur (20-27 °C).

BEMÆRK: Undgå at bringe hele hætteglassene med ES, VS og WS til stuetemperatur gentagne gange, da der kun er brug for en del af opløsningen hver gang. Det er bedre at udportionere den mængde, der skal bruges, og bringe hætteglassene tilbage til 2-8 °C lige efter udportionering. Washing NX (WS) anvendes til vitrificering af oocytter.

2. Fyld beholderen til flydende nitrogen med flydende nitrogen (LN<sub>2</sub>) – tilstrækkeligt til at opnå en dybde på 4 tommer eller til at nedsænke kryorøret på holderen – og sæt den ved siden af mikroskopet. Sæt et kryorør eller bæger (uden låg) fast i den nederste klemme på en kryoholder, og nedsænk den i det flydende nitrogen som forberedelse til opbevaring af de vitrificerede prøver.
3. Bestem antallet af prøver, der skal vitrificeres.
4. Sæt en etiket med de nødvendige oplysninger på hver steril petriskål (eller låg) og hver kryoopbevaringsbeholder.
5. Undersøg omhyggeligt vitrificeringsproduktet, inden proceduren startes.
6. Vend forsigtigt hvert hætteglas med ES og VS om for at blande indholdet inden brug.
7. Forbered skålen med dråber af opløsning til vitrificeringsproceduren på følgende måde:

### A. Protokol for vitrificering af OOCYTER (MII):

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

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

1. Dispenser aseptisk en 20 µl dråbe WS, ES1 og ES2 tæt sammen og ES3 på et omvendt låg af en steril petriskål som vist i figur 1, og placer skålen på mikroskopets objektbord:
  - én 20 µl dråbe WS
  - tre 20 µl dråber (60 µl i alt) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Fjern dyrkningsskålen med MII-oocytterne fra inkubatoren, og kontroller prøvernes kvalitet under mikroskop. Når det er muligt, vælges kun oocyt(ter) af den bedste kvalitet på MII-stadiet.  
FORSIGTIG: Minimer prøvernes udsættelse for lys under ækvilibrering i WS, ES- og VS-dråberne.
3. Overfør oocytten (op til 2 ad gangen) med en minimal volumen af mediet fra dyrkningsskålen (i inkubatoren) ind i 20 µl-dråben af WS i ét minut.
4. Lad WS-dråben flyde sammen med ES1 (se figur 1, pil 1) vha. spidsen på transferpipetten, og tillad spontan blanding af de to opløsninger i 2 minutter.
5. Bland derefter dråben af ES2 (pil 2) med de tidligere blandede dråber, og lad den stå i 2 minutter.
6. Overfør oocytten/oocytterne med minimal volumen af opløsningen fra den sammenflydte ES3-dråbe i 6-10 minutter.  
Bemærk: Ækvilibrering af oocyt(ter) i ES3 er færdig, når tykkelsen på zona pellucida og det perivitelline mellemrum er den samme. Oocytten/oocytterne vil bundfælde sig i bunden af dråben inden for 3 minutter.
7. Under ækvilibreringstiden i ES3 dispenseres aseptisk en (1) 50 µl dråbe af VS, før ækvilibrering færdiggøres, og det valgte vitrificeringsprodukt klargøres til påfyldning (figur 2).
8. Følgende trin (9-13) skal udføres på 80-110 sekunder.  
FORSIGTIG: Eksponering af prøver for VS skal begrænses for at forhindre cytotoxicitet. Prøven/prøverne har tendens til at flyde i VS. Derfor skal fokus justeres på mikroskopet for at vedligeholde kontinuerlig visualisering under eksponering. Hold spidsen af transferpipetten tæt på for at sikre hurtig overførsel mellem dråberne. Se figur 2.
9. Skyl og fyld transferpipetten med VS, umiddelbart inden ækvilibrering i ES er færdig, træk prøven/prøverne op i pipettespidsen med minimal volumen af ES, og overfør den til VS-dråben i 50-60 sekunder. Tøm oocytterne ud i bunden af VS. Når de udtømmes, vil oocytterne flyde op til toppen af VS. For at sikre fuldstændig skylning med VS flyttes oocytterne tilbage i midten af bunden i VS ved pipettering.  
Under denne proces vil oocytterne blive dehydreret og flyde tilbage igen.
10. Indfør og forsegl vitrificeringsproduktet som anvist af producenten.
11. Placer de(n) vitrificerede prøve/prøver på det valgte vitrificeringsprodukt i det nedsænkede kryorør eller bæger fyldt med LN<sub>2</sub> (på kryoholderen) – figur 3. Sæt låg på kryorøret (eller bægeret), eller sæt det omvendt sammen med et andet kryorør uden låg for at sikre det vitrificerede produkt i flydende nitrogen.
12. Flyt beholderen med flydende nitrogen, LN<sub>2</sub> hen ved siden af LN<sub>2</sub>-kryofryseren, og overfør kryoholderen med dens indhold til kryofryseren med henblik på langtidsoptbevaring.

### B. Vitrificeringsprotokol for EMBRYONER (PN til blastocyster):

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

5. Skyl og fyld transferpipetten med VS, umiddelbart inden ækvilibrering i ES er færdig, træk prøven/prøverne op i pipettespidsen med minimal volumen af ES, og overfør den/dem til VS-dråben i mindst 30 sekunder. Tøm embryonerne ud i bunden af VS. Når de udtømmes, vil embryonerne flyde op til toppen af VS. For at sikre fuldstændig skyning med VS flyttes embryonerne forsigtigt tilbage i midten af bunden i VS ved pipettering.  
BEMÆRK 2: Under denne proces vil embryonerne blive dehydreret og flyde tilbage igen.
6. Indfør og forsegl vitrificeringsproduktet som anvist af producenten.
7. Placer det valgte vitrificeringsprodukt i det nedsænkede kryorør eller bæger fyldt med LN<sub>2</sub> (på kryoholderen) – figur 3. Sæt låg på kryorøret (eller bægeret), eller sæt det omvendt sammen med et andet kryorør uden låg for at sikre det vitrificerede produkt i flydende nitrogen.
8. Flyt beholderen med flydende nitrogen, LN<sub>2</sub>, hen ved siden af LN<sub>2</sub>-kryofryseren, og overfør kryoholderen med dens indhold til kryofryseren med henblik på langtidsoptbevaring.

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

#### **ANVISNINGER FOR OPBEVARING OG STABILITET**

Uåbnede hætteglas opbevares ved 2 °C til 8 °C. Når Vit Kit - Freeze NX-opløsninger opbevares som anvist, er de stabile indtil udløbsdatoen på hætteglassenes etiketter.

Medierne må ikke bruges i mere end fjorten (14) dage, når beholderne er blevet åbnet.

Eftersom der er humant kildemateriale i produktet, kan det udvikle partikler under opbevaring. Denne type partikler vides ikke at have en indvirkning på produktets dybeve.

#### **FORHOLDSREGLER OG ADVARSLER**

Dette produkt er beregnet til brug af personale, der er uddannet i procedurer forbundet med assisteret reproduktion. Disse procedurer inkluderer den anvendelse, som produktet er beregnet til.

Den institution, som bruger produktet, er ansvarlig for at opretholde sporbarheden af produktet og skal, hvor det er muligt, overholde gældende, nationale bestemmelser for sporbarhed.

Anvend ikke et hætteglas med opløsning, der er beskadiget, lækker, indeholder partikler eller er uklart. Bortskaf produktet iht. gældende forskrifter.

Undgå problemer med kontamination ved at bruge aseptiske teknikker.

Langtidsvirkningerne af vitrificering af oocytter og embryoner forbliver ukendte ifølge forskningslitteraturen.

Flasker, hvis sterile emballage er blevet kompromitteret, må ikke anvendes.

**EU:** Standardforanstaltninger til forebyggelse af infektioner, der skyldes brug af lægemidler tilberedt ud fra humant blod eller plasma, inkluderer udvælgelse af donorer, screening af individuelle donationer og plasmapools for specifikke infektionsmarkører og inklusion af effektive fremstillingsprocedurer mhp. inaktivering/fjernelse af vira. På trods af dette kan risikoen for overførsel af smittefarlige stoffer ikke helt udelukkes ved administration af lægemidler, der er tilberedt ud fra humant blod eller plasma. Dette gælder også for ukendte eller nyfremkomne vira og andre patogener. Der foreligger ingen rapporter om dokumenterede virusoverførsler med albumin fremstillet ifølge specifikationerne i Den Europæiske Farmakopé ved hjælp af etablerede processer. Det anbefales kraftigt at registrere produktets navn og batchnummer, hver gang der administreres et dyrkningsmedium fra reproduktionsmiddelprodukter fra FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. til en patient. Herved opretholdes tilknytningen mellem patienten og produktbatchen.

**USA:** Dette produkt indeholder humant serumalbumin (HSA). Humant kildemateriale, som er anvendt til fremstilling af dette produkt, er blevet testet med analysesæt, der er licenseret af FDA (fødevarer- og lægemiddelstyrelsen i USA) og er fundet ikke-reaktivt over for antistoffer mod hepatitis C (HCV) og antistoffer mod human immunodefektivirus (HIV). Ingen testmetode kan imidlertid helt garantere, at produkter, som er afledt af humant kildemateriale, ikke er smittefarlige. Håndter alt humant kildemateriale som værende smittefarligt og overhold de universelle forsigtighedsregler. Donorerne af kildematerialet er også blevet screenet for Creutzfeldt-Jakobs sygdom (CJD).

#### **KONTRAINDIKATION**

Dette produkt indeholder gentamicinsulfat. Passende forholdsregler skal overholdes for at sikre, at patienten ikke er sensibiliseret mod dette antibiotikum.



**EU-VAROITUS:** Vain ammattikäyttöön.

### KÄYTTÖTARKOITUS

Vit Kit - Freeze NX on tarkoitettu käytettäväksi avusteisissa lisääntymisenetelmissä ihmisen oosyyttien (MI) pronukleaaristen (PN) tsygoottien vitrifikaatioon ja säilytykseen päivän 3 jakautumisvaiheen alkioista blastokystavaiheen alkioihin.

### LAITTEEN KUVAUS

**Equilibration NX-ES** on kaksoispuskuroitu (HEPES ja MOPS) Continuous Single Culture Medium (CSCM) -elatusaineen liuos, joka sisältää gentamysiinisulfaattia, 7,5 % (tilavuus/tilavuus) sekä DMSO:ta että eteeniglykolia ja 20 % (tilavuus/tilavuus) Dextran Serum Supplement (DSS) -liuosta.

**Vitrification NX-VS** on kaksoispuskuroitu (HEPES ja MOPS) CSCM-liuos, joka sisältää gentamysiinisulfaattia, 15 % (tilavuus/tilavuus) sekä DMSO:ta että eteeniglykolia, 20 % (tilavuus/tilavuus) DSS-liuosta ja 0,5 M trehaloosia.

**Washing NX-WS** on kaksoispuskuroitu (HEPES ja MOPS) CSCM-liuos, joka sisältää gentamysiinisulfaattia ja 20 % DSS-liuosta.

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

Näitä liuoksia käytetään peräkkäin asteittaisen mikropisaravitrifikaatiomenetelmän mukaan.

### KOOSTUMUS

#### Suolat ja ionit

kaliumfosfaatti  
natriumkloridi  
kaliumkloridi  
magnesiumsulfaatti  
kalsiumkloridi

#### Aminohapot

L-arginiini  
glysiini  
L-histidiini  
L-lysiini  
L-proliini  
L-tyrosiini  
L-alaniini  
L-asparagiinihappo  
L-asparagiini  
L-glutamiinihappo  
L-isoleusiini  
L-leusiini  
L-alanyyli-L-glutamiini  
L-metioniini

L-fenyylialaniini  
L-seriini  
L-treoniini  
L-tryptofaani  
L-valiini  
L-kystiini

#### Energiasubstraatit

deksstroosi  
natriumpyruvaatti  
natriumlaktaatti

#### Proteiini

ihmisen seerumialbumiini HSA

#### Puskuri

natriumbikarbonaatti  
HEPES  
MOPS

#### Antioksidantit

natriumsitraatti  
EDTA

#### Antibiootit

gentamysiinisulfaatti

#### Kryoprotektantit

dekstraani  
trehaloosi  
eteeniglykoli  
dimetyylisulfoksidi

### LAADUNVARMENNUS

Vit Kit - Freeze NX -pakkauksen liuokset ovat kalvosuodatettuja ja valdoidujen valmistusmenetelmien mukaisesti aseptisesti käsiteltyjä.

Jokaiselle Vit Kit - Freeze NX -erälle tehdään seuraavat testit:

- endotoksiini Limulus Amebocyte Lysate (LAL) -menetelmällä ( $\leq 0,6$  EU/ml) testien USP Bacterial Endotoxins <85> ja Ph. Eur. 2.6.14 mukaan
- hiiren alkioääritys (yksi solu) (laajenee  $\geq 80$ -prosenttisesti blastokysteiksi)
- steriiliteetti nykyisellä USP-steriiliteetikokeella <71>, Ph. Eur. 3.2 (läpäisytt).

Kaikki koetulokset ilmoitetaan eräkohtaisesti analyysitodistuksella, joka on pyynnöstä saatavissa.

### TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOITA EI TOIMITETA MUKANA

- Valinnan mukainen vitrifikaatiolaitte
- Steriilejä petrimaljoja (50 X 9 mm, Falcon 351006 tai vastaava)
- Kryoputkia (4,5 ml) tai kryoputkiaistoita ja kryoputkipidikkeitä
- Hyaluronidaasia (luettelonro 90101) oosyyttien vitrifikaatioon
- Kertakäyttökäsineitä
- Siirtopipettejä (vedettyjä lasipipettejä tai mikropipettejä, joiden kärjen sisäläpimitta on noin 200  $\mu$ m)
- Pinsetit tai atulat
- Sekuntikello tai ajastin
- Nestetyypisäiliö (Dewar-astia tai kannellinen styroksiaastia, tilavuus 1–2 l)
- Nestetyyppeä (riittävä tilavuus 4 tuuman syvyyden saavuttamiseksi säiliössä)

### KÄYTTÖOHJEET

Tarvittavat Vit Kit - Freeze NX -ainesosat (käyttösovelluksen mukaan):

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l oosyyttien vitrifikaatiomenetelmää varten  
tai  
50  $\mu$ l alkioiden vitrifikaatiomenetelmää varten
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ l kumpaakin vitrifikaatiomenetelmää varten
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ l oosyyttien vitrifikaatiomenetelmää varten

## VITRIFIKAATIOMENETELMÄ:

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

1. Ota käyttöön tuleva määrä ES-, VS- ja WS-liuoksia huoneenlämpöön (20–27 °C).  
HUOMAUTUS: Vältä koko ES-, VS- ja WS-pullojen saattamista huoneenlämpöiseksi toistuvasti, silloin kun käyttökerralla tarvitaan vain osa liuoksesta. On parempi ottaa yksi erä, joka käytetään, ja palauttaa pulat 2–8 °C:n lämpötilaan heti erän ottamisen jälkeen. Washing NX (WS) -liuosta käytetään oosyyttien vitrifikaatioon.
2. Täytä nestetyypisäiliö nestetyypellä (LN<sub>2</sub>) – riittävä määrä, jotta saadaan 4 tuuman syvyys tai jotta kryoputkipidikkeessä oleva kryoputki voidaan upottaa kokonaan – ja aseta säiliö mikroskoopin lähelle. Kiinnitä kryoputki tai kryoputkiasia (korppi avattuina) kryoputkipidikkeen pohjaklipsiin ja upota nestetyyppiä valmisteluna vitrifioitujen näytteiden säilyttämistä varten.
3. Määritä vitrifioitavien näytteiden määrä.
4. Merkitse jokainen petrimalja (tai kansi) sekä kryosäiliöväline tarvittavilla tiedoilla.
5. Tarkasta huolella vitrifikaatiolaitte ennen toimenpiteen aloittamista.
6. Käännä varovasti jokainen ES- ja VS-pullo sisällön sekoittamiseksi ennen käyttöä.
7. Valmistele malja, jossa on vitrifiointitoimenpiteen nestepisararat.

## A. OOSYYTTIEN (MII) vitrifikaatiomenetelmä:

HUOMAUTUS 1: Kerätyt oosyytit paljastetaan hyaluronidaasilla sen varmistamiseksi, että vaihe on MII.

HUOMAUTUS 2: Katso alkioiden vitrifikaatiomenetelmä osiosta B.

1. Jaa aseptisesti 20 µl:n pisara WS-, ES1- ja ES2-liuosta toisiaan lähemmäksi ja ES3-pisara steriiliin petrimaljan käännetylle kannelle kuten kuvassa 1. Aseta kansi mikroskooppialustalle:
  - yksi 20 µl:n pisara WS-liuosta
  - kolme 20 µl:n pisaraa (yhteensä 60 µl) ES-liuoksia (ES1, ES2, ES3).
2. Poista MII-oosyyttejä sisältävä viljelymalja lämpökaapista ja tarkista näytteiden laatu mikroskoopin avulla. Jos mahdollista, valitse vain parhaan laadun MII-vaiheen oosyytti (tai oosyyttejä).  
VAROITUS: Minimoi näyteen (tai näytteiden) altistuminen valolle WS-, ES- ja VS-pisaroissa tasapainottumisen aikana.
3. Siirrä oosyytti (enintään 2 kerrallaan) ja minimimäärä elatusainetta viljelymaljalta (lämpökaapista) 20 µl:n WS-pisaraan yhden minuutin ajaksi.
4. Yhdistä WS-pisara ES1-pisaraan (ks. kuva 1, nuoli 1) siirtopetin kärjen avulla. Anna näiden kahden liuoksen spontaanin sekoittumisen tapahtua 2 minuutin ajan.
5. Yhdistä sitten ES2-pisara (nuoli 2) aiemmin yhdistettyihin pisaroihin. Anna seistä 2 minuutin ajan.
6. Siirrä oosyytti (tai oosyytit) ja minimimäärä liuosta yhdistetystä pisarasta ES3-pisaraan 6–10 minuutin ajaksi.  
Huomautus: oosyyttien tasapainottuminen ES3:een on valmis, kun munasolun kettu paksaus ja ruskaista ympäriävä tila ovat yhtä suuria. Oosyytit asetuvat pisaran pohjaan tyypillisesti 3 minuutin kuluessa.
7. Kun tasapainottuminen ES3-pisarassa on käynnissä, jaa aseptisesti yksi (1) 50 µl:n pisara VS-liuosta ennen tasapainottumisen valmistumista. Valmistele valinnan mukainen vitrifikaatiolaitte latausta varten (kuva 2).
8. Seuraavat vaiheet (9–13) on saatava valmiiksi 80–110 sekunnin kuluessa.
9. VAROITUS: Näytteiden altistumista VS-liuokselle on rajoitettava sytoksisuuden estämiseksi. Näytteillä on taipumus kellua VS-liuoksessa, joten säädä mikroskoopin fokus niin, että säilytät jatkuvan näkökentän altistumisen aikana. Pidä siirtopetittä lähellä, jotta voit varmistaa nopean siirtämisen pisaroiden välillä. Katso kuva 2.
9. Huuhtelee ja täytä siirtopetin kärki VS-liuoksella juuri ennen kuin tasapainottuminen ES-pisarassa on valmis. Ime näyte (näytteet) ja minimiilavuus ES-liuosta pipetin kärkeen ja siirrä VS-pisaraan 50–60 sekunnin ajaksi. Siirrä oosyytit VS-pisaran pohjaan. Kun oosyytit siirretään, ne siirtyvät kellumaan VS-pisaran yläosaan. Jotta oosyyttien täydellinen huuhtelu VS-liuoksella valmistetaan, siirrä ne varovasti takaisin VS-pisaran alaosaan keskelle pipetin avulla.  
Tämän toimenpiteen aikana oosyytit dehydroituvat ja siirtyvät takaisin kellumaan.
10. Lataa ja sulje vitrifikaatiolaitte valmistajan ohjeiden mukaisesti.
11. Aseta vitrifioidut näytteet valinnan mukaiseen vitrifikaatiolaitteeseen LN<sub>2</sub>-täytettyyn kryoputkeen tai (kryoputkipidikkeessä olevaan) kryoputkiasiaan, ks. kuva 3. Sulje kryoputki (tai kryoputkiasia) korrilla tai kiinnitä ylösalaisin toiseen avattuun kryoputkeen vitrifikaatiolaitteen kiinnittämiseksi nestetyyppeen.
12. Siirrä LN<sub>2</sub>-säiliö lähelle LN<sub>2</sub>-kryopakastinta ja siirrä kryoputkipidike sisältöineen kryopakastimeen pitkäaikaiseen säilytykseen.

## B. ALKIOIDEN (prenuklearisesta blastokystaan) vitrifikaatiomenetelmä:

1. Jaa aseptisesti yksi 50 µl:n pisara ES-liuosta petrimaljan käännettyyn kanteen (kuva 4).
2. Poista alkion tai alkioita sisältävä viljelymalja lämpökaapista ja tarkista näyteen laatu mikroskoopin avulla. Jos mahdollista, valitse vain parhaan laadun alkio (alkioita) vitrifikaatioon.
3. Siirrä varovasti näyte (enintään kaksi kerrallaan) ja minimiilavuus elatusainetta viljelymaljalta ES-pisaraan ja käynnistä ajastin. Alkioiden pitäisi tasapainottua ES-pisaraan hitaasti ja vapaasti pudoten 6–10 minuutin ajan.  
HUOMAUTUS 1: Näyte kutistuu ja palaa sitten asteittain alkuperäiseen kokoonsa, mikä osoittaa, että tasapainottuminen on valmis.  
VAROITUS: Minimoi näyteen (tai näytteiden) altistuminen valolle ES- ja VS-pisaroissa tasapainottumisen aikana.
4. Kun tasapainottuminen ES-pisarassa on käynnissä, jaa aseptisesti yksi 50 µl:n pisara VS-liuosta kuvan 4 mukaisesti. Valmistele valinnan mukainen vitrifikaatiolaitte latausta varten.



5. Huuhtele ja täytä siirtopipetin kärki VS-liuoksella juuri ennen kuin tasapainottuminen ES-pisarassa on valmis. Ime näyte (näytteet) ja minimiilavuus ES-liuosta pipetin kärkeen ja siirrä VS-pisaraan vähintään 30 sekunnin ajaksi. Siirrä alkiot VS-pisaran pohjaan. Kun alkiot siirretään, ne siirtyvät kellumaan VS-pisaran yläosaan. Jotta alkioiden täydellinen huuhtelu VS-liuoksella varmistetaan, siirrä ne varovasti takaisin VS-pisaran alaosaan keskelle pipetin avulla.  
HUOMAUTUS 2: Tämän toimenpiteen aikana alkiot dehydroituvat ja siirtyvät takaisin kellumaan.
6. Lataa ja sulje vitrifikaatiolaitte valmistajan ohjeiden mukaisesti.
7. Aseta valinnan mukainen vitrifikaatiolaitte LN<sub>2</sub>-täytettyyn kryoputkeen tai (kryoputkipidikkeessä olevaan) kryoputkiastiaan, ks. kuva 3. Sulje kryoputki (tai kryoputkiastia) korkilla tai kiinnitä ylösalaisin toiseen avattuun kryoputkeen vitrifikaatiolaitteen kiinnittämiseksi nestetyypeen.
8. Siirrä LN<sub>2</sub>-säiliö lähelle LN<sub>2</sub>-kryopakastinta ja siirrä kryoputkipidike sisältöineen kryopakastimeen pitkäaikaiseen säilytykseen.

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

#### **SÄILYTYSOHJEET JA STABIILIUUS**

Säilytä avaamattomat pullo jääkaapissa 2–8 °C:ssa. Kun Vit Kit – Freeze NX -liuoksia säilytetään ohjeiden mukaan, ne ovat stabiileja etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Kun säiliöt on avattu, älä käytä elatusainetta yli neljäntoista (14) päivän ajan.

Koska tuote sisältää ihmisperäistä materiaalia, siihen voi muodostua hieman hiukkasia säilytyksen aikana. Tämän tyyppisillä hiukkasilla ei tiedetä olevan mitään vaikutusta tuotteen toimintakykyyn.

#### **VAROTOIMET JA VAROITUKSET**

Tämä laite on tarkoitettu avusteisiin lisääntymistoimenpiteisiin koulutetun henkilöstön käyttöön. Näihin toimenpiteisiin kuuluu se aiottu käyttö, johon tämä laite on tarkoitettu.

Tämän laitteen käyttäjälaitoksen vastuulla on säilyttää tuotteen jäljitettävyyden, ja laitoksen on noudatettava jäljitettävyyttä koskevia asianmukaisia kansallisia säännöksiä.

Älä käytä mitään liuospulloa, jos siinä on vaurion tai vuodon merkkejä tai jos liuoksessa näkyy hiukkasia tai se on sameaa. Hävitä tuote sovellettavien säännösten mukaisesti.

Kontaminaatio-ongelmien välttämiseksi käsittelyssä tulee noudattaa aseptisia menetelmiä.

Tämän hetkinen tutkimuskirjallisuus osoittaa, että oosyyttien ja alkioiden vitrifikaation pitkäaikaisia vaikutuksia ei tunneta.

Älä käytä pulloa, jos sen steriili pakkaus ei ole ehjä.

**EU:** Ihmisen verestä tai plasmasta valmistettujen lääkinnällisten tuotteiden käytöstä johtuvien infektioiden torjunnan vakiomenetelmiä ovat luovuttajien valinta, yksittäisten luovutusten ja plasmapoolien seulonta spesifisten infektiomerkkiaineiden suhteen ja tehokkaiden valmistusvaiheiden käyttäminen virusten inaktivointia tai poistoa varten. Tästä huolimatta ihmisen verestä tai plasmasta valmistettuja lääkevalmisteita käytettäessä ei voida kokonaan sulkea pois tartunnanaiheuttajien siirtymisen mahdollisuutta. Tämä koskee myös tuntemattomia tai kehittyviä viruksia ja muita patogeenejä. Mitään ilmoituksia todetuista virustartunnoista ei ole saatu Euroopan farmakopeamääritysten mukaisesti vakiintuneilla menetelmillä valmistettuun albumiiniin liittyen. On erittäin suositeltavaa, että aina kun FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. -yhtiön lisääntymismenetelmiin tarkoitettuja viijelyliuoksia annetaan potilaalle, tuotteen nimi ja eränumero kirjataan, jotta yhteys potilaan ja tuote-erän välillä säilyy.

**USA:** Tämä tuote sisältää ihmisen seerumialbumiinia (HSA). Tämän tuotteen valmistuksessa käytetyn ihmisperäisen aineen on FDA:n lisensioimilla testipakkauksilla todettu olevan ei-reaktiivista C-hepatiitin (HCV) vasta-aineille ja ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) vasta-aineille. Mikään testausmenetelmä ei kuitenkaan tarjoa täydellistä varmuutta siitä, että ihmisperäiset tuotteet eivät aiheuta tartuntaa. Käsittele kaikkea ihmisperäistä materiaalia yleisiä varotoimenpiteitä käyttäen ikään kuin se voisi aiheuttaa infektion. Lähdeaineiden luovuttajat on seulottu myös CJD:n suhteen.

#### **VASTA-AIHE**

Tuote sisältää gentamysiinisulfaattia. On varmistettava tarkoituksenmukaisiin varokeinoin, ettei potilas ole herkistynyt tälle antibiootille.



**ES BRĪDINĀJUMS:** tikai profesionālai lietošanai.

### PAREDZĒTAIS LIETOJUMS

„Vit Kit - Freeze NX” ir paredzēts lietošanai ar palīgīdzekļiem veicamās reproduktīvajās procedūrās cilvēka ovocītu (MII), pronukleāru (PN) zigotu līdz embriju 3. dalīšanas dienai, kā arī blastocīstu stadijas embriju vitrifikācijai un uzglabāšanai.

### IERĪCES APRAKSTS

„**Equilibration NX-ES**” ir duāls „Continuous Single Culture Medium” (CSCM) buferšķīdums (HEPES & MOPS), kas satur gentamicīna sulfātu, pa 7,5% (v/v) DMSO un etilēnglikola, kā arī 20% (v/v) „Dextran Serum Supplement” (DSS).

„**Vitrication NX-VS**” ir duāls „Continuous Single Culture Medium” (CSCM) buferšķīdums (HEPES & MOPS), kas satur gentamicīna sulfātu, pa 15% (v/v) DMSO un etilēnglikola, kā arī 20% (v/v) DSS un 0,5 M trehalozes.

„**Washing NX-WS (WS)**” ir duāls „Continuous Single Culture Medium” (CSCM) (HEPES un MOPS) buferšķīdums, kas satur gentamicīna sulfātu un 20% DSS.

DSS ir proteīnu piedeva, kas sastāv no 50 mg/ml terapeitiskās kategorijas cilvēka seruma albumīna (HSA) un 20 mg/ml dekstrāna. DSS 20% (v/v) lieto „Vit Kit – Freeze NX”, iegūstot 10 mg/ml galīgo HSA un 4 mg/ml dekstrāna koncentrāciju.

Šie šķīdumi ir jālieto secīgi saskaņā ar soli pa solim veicamo mikropilienu vitrifikācijas protokolu.

### SASTĀVS

#### Sāļi un joni

Kālija fosfāts  
Nātrija hlorīds  
Kālija hlorīds  
Magnija sulfāts  
Kalcija hlorīds

#### Aminoskābes

L-arginīns  
Glicīns  
L-histidīns  
L-lizīns  
L-prolīns  
L-tirozīns  
L-alanīns  
L-asparagīnskābe  
L-asparagīns  
L-glutamīnskābe  
L-izoleicīns  
L-leicīns  
L-alanil-L-glutamīns  
L-metionīns

#### L-fenilalanīns

L-serīns  
L-treonīns  
L-triptofāns  
L-valīns  
L-cistīns

#### Enerģijas avoti

Dekstroze  
Pirovīnogskābes nātrija sāls  
Nātrija laktāts

#### Buferšķīdums

Nātrija bikarbonāts  
HEPES  
MOPS

#### Antioksidanti

Nātrija citrāts  
EDTA

#### Proteīni

Cilvēka seruma albumīns, HSA

#### Krioprotektanti

Dekstrāns  
Trehaloze  
Etilēnglikols  
Dimetilsulfoksīds

### KVALITĀTES NODROŠINĀŠANA

„Vit Kit - Freeze NX” šķīdumi ir filtrēti caur membrānu un aseptiski apstrādāti saskaņā ar apstiprinātām ražošanas procedūrām.

Katra „Vit Kit - Freeze NX” partija tiek testēta, izmantojot turpmāk minētos testus.

- Endotoksīni – ar Limulus amebocīta lizāta (LAL) metode ( $\leq 0,6$  EV/ml), izmantojot ASV farmakopejas (*United States Pharmacopoeia* – USP) baktēriju endotoksīnus <85> un Eiropas farmakopeja (*European Pharmacopoeia* – Eur. Ph. 2.6.14).
- Peles embrija pārbaude ( $\geq 80\%$  paplašinātājā blastocīstu stadijā).
- Sterilitāte ar pašreizējo USP sterilitātes testu <71>, Eur. Ph. 3.2 (izpildīts).

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

### NEPIECIEŠAMIE MATERIĀLI, KAS NETIEK IEKĻAUTI

- Vitrifikācijas ierīce pēc izvēles
- Sterili Petri trauciņi (50 X 9 mm, Falcon 351006 vai līdzvērtīgi)
- Kriostobriņi (4,5 ml) vai kausiņi un krioturētāji
- Hialuronidāze (kataloga Nr. 90101) ovocītu vitrifikācijai
- Vienreizlietojami cimdi
- Pipetes pārnesei (izstiepta stikla pipetes vai mikropipešu uzgaļi ar uzgaļa iekšējo diametru ~200  $\mu$ m)
- Pincetes vai knaibītes
- Hronometrs vai taimeris
- Šķidrā slāpekļa rezervuārs (Djuāra vai putuplasta trauks ar vāku, tilpums 1–2 l)
- Šķidrās slāpekļi (pietiekami daudz 4 collu biežam slānim rezervuārā)

### LIETOŠANAS NORĀDĪJUMI

„Vit Kit - Freeze NX” komponentiem izvirzītās prasības (atbilstoši lietošanas veidam):

- „Equilibration NX-ES” (ES):  
60  $\mu$ l ovocītu vitrifikācijas protokolam  
vai  
50  $\mu$ l embriju vitrifikācijas protokolam

- „Vitrification NX-VS” (VS):  
50 µl jebkuram no abiem vitrificācijas protokoliem
- „Washing NX-WS” (WS):  
20 µl ovocītu vitrificācijas protokolam

## VITRIFIKĀCIJAS PROTOKOLS:

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

1. Lietošānai paredzētā ES, VS un WS daudzumu sasildiet līdz istabas temperatūrai (20–27 °C).  
PIEZĪME: ja katru reizi nepieciešama daļa ES, VS vai WS flakona, tos nedrīkst pilnībā atkārtoti sasildīt līdz istabas temperatūrai. Labāk sadalīt lietošanai paredzēto daudzumu vienādās daļās un flakonus novietot atpakāļ 2–8 °C uzreiz pēc sadalīšanas. „Washing NX” (WS) lieto ovocītu vitrificācijai.
2. Šķidrā slāpekļa rezervuāru uzpildiet ar šķīdru slāpekli (SS<sub>2</sub>) – pietiekami daudz 4 collu biežam slānim vai arī, lai pilnībā iegremdētu kriostobriņu uz krioturētāja, un novietojiet blakus mikroskopam. Kriostobriņu vai kriokausiņu (bez vāciņa) pievienojiet krioturētāja apakšējai skavai un iemēriet šķīdrajā slāpekļī, lai sagatavotos vitrificēto paraugu uzglabāšanai.
3. Nosakiet vitrificējamo paraugu skaitu.
4. Katru sterilo Petri trauciņu (vai vāciņu) un kriozglabāšanas ierīci marķējiet ar nepieciešamo informāciju.
5. Pirms procedūras sākšanas rūpīgi pārbaudiet vitrificācijas ierīci.
6. Pirms lietošanas saudzīgi apgrieziet ES un VS flakonus, lai samaisītu saturu.
7. Sagatavojiet trauciņu ar šķīdumu pilieniem vitrificācijas procedūrai, rīkojoties turpmāk minētajā veidā.

### A. OVOCĪTU (MI) vitrificācijas protokols

1. PIEZĪME: iegūtie ovocīti tiek attīrīti ar hialuronidāzi, lai apstiprinātu, ka tie ir MI.
2. PIEZĪME: embriju vitrificācijas protokolu skatīt B sadaļā.
  1. Aseptiskā veidā piliniet pa vienam WS, ES1 & ES2 20 µl šķīduma pilenam tuvu vienu otram un ES3 uz otrādi apgriezta sterila Petri trauciņa vāciņa, kā parādīts 1. attēlā, un novietojiet trauciņu uz mikroskopa platformas:
    - viens 20 µl pilniens WS
    - trīs 20 µl pilieni (kopā 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
  2. Izņemiet kultūras trauciņu ar MI ovocītiem no inkubatora un mikroskopā pārbaudiet parauga(-u) kvalitāti. Ja iespējams, izvēlieties tikai vislabākās kvalitātes MI stadijas ovocītus.  
UZMANĪBU! Parauga(-u) līdzsvarošanas WS, ES un VS pilienos laikā maksimāli samaziniet gaismas iedarbību.
  3. Ovocītu (līdz 2 vienlaicīgi) ar minimālu šķīduma daudzumu no kultūras trauciņa (inkubatorā) uz vienu minūti pārnēsiet WS 20 µl pilienā.
  4. Izņemtoji pārņemšanai paredzētās pipetes uzgali, WS pilienus sapludiniet ar ES1 (skatīt 1. attēla 1. buliņu) un ļaujiet 2 minūtes notikt abu šķīdumu spontānai saplušanai.
  5. Tad ES2 (2. buliņa) sapludiniet ar iepriekš sapludinātajiem pilieniem un atstājat uz 2 minūtēm.
  6. Ovocītu(-s) minimālajā šķīduma daudzumā uz 6–10 minūtēm pārnēsiet no sapludinātā šķīduma pilienus uz ES3 pilienus.  
Piezīme: ovocīta(-u) līdzsvarošana ES3 ir pabeigta, kad olšūnas caurspīdīgais apvalks (*zona pellucida*) un perivitēlīnās telpas biežums ir vienāds. Ovocīts(-i) pilienā nogulsnesies parasti 3 minūšu laikā.
  7. Līdzsvarošanas laikā ES3 aseptiskā veidā pārnēsiet vienu (1) 50 µl pilienus VS, lai pabeigtu līdzsvarošanu un sagatavojiet izvēlēto vitrificācijas ierīci uzpildīšanai (2. attēls).
  8. 80–110 sekundēs jāveic tālāk norādītās darbības (9–13).  
UZMANĪBU! Lai nepieļautu citotoksicitāti, VS iedarbība uz paraugiem ir jāierobežo. Paraugam(-iem) ir tieksme peldēt VS, tāpēc pielāgojiet mikroskopa fokusu, lai saglabātu nepārtrauktu vizualizāciju iedarbības laikā, bet pārņemšanai paredzētās pipetes uzgali turiet tuvumā, lai nodrošinātu ātru pārņemšanu no viena piliena uz otru. Skatīt 2. attēlu.
  9. Izskalojiet pārņemšanai paredzēto pipetes uzgali un uzpildiet to ar VS tieši pirms līdzsvarošanas ES ir pabeigta, atsūciet pipetes uzgali paraugu(-us) ar minimālu ES daudzumu, un pārnēsiet tos VS pilienā uz 50–60 sekundēm. Ovocītus ievadiet VS apakšējā daļā. Ievadīšanas laikā ovocīti uzpeldēs VS. Lai nodrošinātu kārtīgu skalošanu VS, ar pipetes palīdzību saudzīgi pārvietojot ovocītus atpakāļ lejā VS centrālajā daļā.  
Šī procesa laikā ovocīti tiks dehidratēti un atkal uzpeldēs.
  10. Uzpildiet un noslēdziet vitrificācijas ierīci, kā norādīts ražotājs.
  11. Izvēlēto vitrificēto paraugu(-s) izvēlētajā vitrificācijas ierīcē ievietojiet iegremdētajā ar SS<sub>2</sub> iegremdētajā uzpildītajā kriostobriņā vai kriokausiņā (uz krioturētāja), kā norādīts 3. attēlā. Uzlieciet kriostobriņam (vai kriokausiņam) vāciņu vai arī pievienojiet otrādi ar vēl vienu kriostobriņu bez vāciņa, lai nodrošinātu, ka vitrificētā ierīce paliek šķīdrajā slāpekļī.
  12. SS<sub>2</sub> rezervuāru pārvietojiet blakus SS, kriosaldētājam un krioturētājam ar saturu pārnēsiet uz kriosaldētāju ilgstoši uzglabāšanai.

### B. EMBRIJU (PN vai blastocistas) vitrificācijas protokols:

1. Aseptiskā veidā vienu 50 µl pilienus ES piliniet uz otrādi apgriezta Petri trauciņa vāku (skatīt 4. attēlu).
2. Izņemiet kultūras trauciņu ar embriju(-iem) no inkubatora un mikroskopā pārbaudiet parauga(-u) kvalitāti. Ja iespējams, izvēlieties tikai vislabākās kvalitātes embriju(-s).
3. Paraugu (ne vairāk par diviem vienlaicīgi) no kultūras trauciņa saudzīgi, kopā ar minimālu barotnes daudzumu, pārnēsiet uz ES pilienus un iedarbiniet taimerī.

Embrijiem ES pilienā jālīdzsvarojas lēni brīvāji kritienā 6–10 minūšu laikā.

1. PIEZĪME: paraugs saruks, bet tad pakāpeniski atgūs savu sākotnējo izmēru, kas liecinās, ka līdzsvarošana ir pabeigta.  
UZMANĪBU! Parauga(-u) līdzsvarošanas ES un VS pilienos laikā maksimāli samaziniet gaismas iedarbību.

4. Šīs līdzsvarošanas laikā ES aseptiskā veidā pārnesiet vienu 50 µl pilieni VS šķīduma, kā parādīts 4. attēlā, un sagatavojiet uzpildīšanai izvēlēto vitrifikācijas ierīci.
5. Izskalojiet pārmešanai paredzēto pipetes uzgali un uzpildiet to ar VS tieši pirms līdzsvarošana ES ir pabeigta, atsūciet pipetes uzgali paraugu(-s) ar minimālu ES daudzumu, un pārnesiet tos VS pilienā uz vismaz 30 sekundēm. Embrijus ievadiet VS apakšējā daļā. Ievadīšanas laikā embriji uzpeldēs VS. Lai nodrošinātu kārtīgu skalošanu VS, ar pipetes palīdzību saudzīti pārvietojot embrijus atpakaļ lejā VS centrālajā daļā.
  2. PIEZĪME: procesa laikā embriji tiks dehidratēti un atkal uzpeldēs.
6. Uzpildiet un noslēdziet vitrifikācijas ierīci, kā norādīts ražotājs.
7. Izvēlēto vitrificēto vitrifikācijas ierīci ievietojiet iegremdētājā ar ŠS<sub>2</sub> iegremdētājā uzpildītājā kriosobriņā (vai krioturētājā), kā norādīts 3. attēlā. Uzlieciet kriosobriņam (vai kriokausīnam) vāciņu vai arī pievienojiet otrādi ar vēl vienu kriosobriņu bez vāciņa, lai nodrošinātu, ka vitrificētā ierīce paliek šķidrā slāpekļī.
8. ŠS<sub>2</sub> rezervuāru pārvietojiet blakus ŠS, kriosaldētājam un krioturētājam ar saturu pārnesiet uz kriosaldētāju ilgstoši uzglabāšanai.

Papildu informācija par šo izstrādājumu lietošanu meklējama katras laboratorijas procedūru aprakstos un protokolos, kas īpaši izstrādāti un optimizēti individuālajai medicīniskajai programmai.

#### **GLABĀŠANAS NORĀDĪJUMI UN STABILITĀTE**

Neatvērtus flakonus uzglabājiet ledusskapī 2–8 °C temperatūrā. Uzglabājot, kā norādīts, „Vit Kit - Freeze NX Solutions” ir stabils līdz derīguma termiņa beigū datumam, kas norādīts flakonu etiķetēs.

Barotnes pēc trauku atvēršanas drīkst lietot ne ilgāk par četrpadsmit (14) dienām.

Tā kā produkts satur cilvēka izcelsmes materiālu, glabāšanas laikā tajā var veidoties daļiņas. Nav pierādīts, ka šī veida daļiņas ietekmē produkta raksturlielumus.

#### **PIESARDZĪBAS PASĀKUMI UN BRĪDINĀJUMI**

Šī ierīce ir paredzēta lietošanai darbiniekiem, kas apguvuši ar pilnglīdzekļiem veicamas reproduktīvās procedūras. Šīs procedūras ietver norādīto izmantošanu, kurai šī ierīce ir paredzēta.

Par izstrādājuma izsekojamības uzturēšanu atbild šīs ierīces lietotāja iestāde, kurai jāievēro valsts noteikumi par izsekojamību, ja tādi ir.

Nelietojiet nevienu šķidruma flakonu, ja tas izskatās bojāts, tek, tajā ir redzamas daļiņas un duļķainums. Produktu likvidēt saskaņā ar spēkā esošajiem noteikumiem.

Lai izvairītos no kontaminācijas radītām problēmām, rīkojieties, izmantojot aseptiskas metodes.

Līdz šim publicētie pētījumi iegūtie rezultāti liecina, ka vitrifikācijas ilgtermiņa ietekme uz ovocītiem un embrijiem pagaidām nav zināma.

Nelietojiet nevienu pudeli, kurai ir bojāts sterlais iesaiņojums.

ES. Standarta pasākumi, lai novērstu infekcijas, ko izraisa no cilvēka asinīm vai plazmas izgatavoti medikamenti, ir donoru atlase, atveišķu donoru materiālu un plazmas fondu skrīnings, lai noteiktu konkrētus infekcijas marķierus, un efektīvas ražošanas procesā iekļautas darbības, lai inaktivētu/atdalītu vīrusus. Neraugoties uz to, ievadot no cilvēka asinīm vai plazmas pagatavotus medikamentus, nevar pilnībā izslēgt infekciozu vielu pārmešanas iespēju. Tas attiecas arī uz nezināmiem vai jaunatklātiem vīrusiem un citiem patogēniem. Nav ziņots par pierādītiem vīrusu pārmešanas gadījumiem, lietojot albumīnu, kas izgatavots ar vispārāzītiem paņēmieniem saskaņā ar Eiropas Farmakopijas specifikācijām. Katru reizi, pacientam ievadot „FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.” reproduktīvām procedūrām paredzēto baroju produktu, stingri ieteicams pierakstīt produkta nosaukumu un sērijas numuru, lai saglabātu sākni starp pacientu un produkta sēriju.

ASV. Šis produkts satur cilvēka seruma albumīnu (HSA). Cilvēka izcelsmes materiāls, kas izmantots šī produkta izgatavošanā, ir pārbaudīts ar FDA apstiprinātiem komplektiem, un konstatēts, ka tas nereaģē ar antivielām pret C hepatītu (HCV) un antivielām pret cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV). Tomēr neviena pārbaudes metode pilnībā negarantē, ka no cilvēka izejmateriāla iegūti produkti nav infekciozi. Ar visiem cilvēka izcelsmes materiāliem rīkojieties tā, it kā tie spētu pārnest infekciju, ievērojot vispārējus piesardzības pasākumus. Izmantojamā materiāla donori tikusi pārbaudīti arī attiecībā uz KJS.

#### **KONTRINDIKĀCIJAS**

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



## NEDERLANDS

**WAARSCHUWING (EU):** Alleen voor professioneel gebruik.

### BEOOGD GEBRUIK

Vit Kit - Freeze NX is bestemd voor gebruik bij geassisteerde voortplantingsprocedures voor vitrificatie en bewaring van menselijke oöcyten (MII), pronucleaire (PN) zygoten van embryo's tot en met dag 3 van de splitsingsfase en embryo's in het blastocyststadium.

### BESCHRIJVING VAN HET HULPMIDDEL

**Equilibration NX-ES** is een dubbel gebufferde oplossing (HEPES en MOPS) van Continuous Single Culture Medium (CSCM) die gentamicinesulfaat, 7,5% (v/v) van zowel DMSO als ethyleenglycol, en 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS) bevat.

**Vitrification NX-VS** is een dubbel gebufferde oplossing (HEPES en MOPS) van CSCM die gentamicinesulfaat, 15% (v/v) van zowel DMSO als ethyleenglycol, 20% (v/v) DSS en 0,5 M trehalose bevat.

**Washing NX-WS** is een dubbel gebufferde oplossing (HEPES en MOPS) van CSCM die gentamicinesulfaat en 20% DSS bevat.

DSS is een eiwit-supplement dat bestaat uit 50 mg/ml menselijk serumalbumine (HSA) van therapeutische kwaliteit en 20 mg/ml dextran. DSS wordt gebruikt bij 20% (v/v) in Vit Kit - Freeze NX tot een eindconcentratie van 10 mg/ml HSA en 4 mg/ml dextran.

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

### SAMENSTELLING

#### Zouten en ionen

Kaliumfosfaat  
Natriumchloride  
Kaliumchloride  
Magnesiumsulfaat  
Calciumchloride

#### Aminozuren

L-arginine  
Glycine  
L-histidine  
L-lysine  
L-proline  
L-tyrosine  
L-alanine  
L-asparaginezuur  
L-asparagine  
L-glutaminezuur  
L-isoleucine  
L-leucine  
L-alanyl-L-glutamine  
L-methionine

L-fenylalanine  
L-serine  
L-treonine  
L-tryptofaan  
L-valine  
L-cystine

#### Energiesubstraten

Dextrose  
Natriumpyruvaat  
Natriumlactaat

#### Eiwit

Menselijk serumalbumine, HSA

#### Buffer

Natriumbicarbonaat  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidanten

Natriumcitraat  
EDTA

#### Antibiotica

Gentamicinesulfaat

#### Cryoprotectanten

Dextran  
Trehalose  
Ethyleenglycol  
Dimethylsulfoxide

### KWALITEITSBORGING

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

Elke partij Vit Kit - Freeze NX ondergaat de volgende tests:

- Endotoxine middels de Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-methode ( $\leq 0,6$  EU/ml) met de Amerikaanse Pharmacopeia Bacterial Endotoxins <85> en de Europese Farmacopee 2.6.14
- Muisembryoassay (eencellig) ( $\geq 80\%$  geëxpandeerde blastocysten)
- Steriliteit met de huidige Amerikaanse Pharmacopeia Sterility Test <71>, Europese Farmacopee 3.2 (voldoet)

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

### MATERIALEN DIE VEREIST, MAAR NIET MEEGELEVERD ZIJN

- Vitrificatiehulpmiddel naar eigen keuze
- Steriele petrischalen (50 x 9 mm, Falcon 351006 of equivalent)
- Cryobuisjes (4,5 ml) of bekertjes en cryohouders
- Hyaluronidase (catalogusnr. 90101) voor vitrificatie van oöcyten
- Disposable handschoenen
- Transferpipetten (getrokken glazen pipetten of micropipetten waarbij de punt een binnendiameter heeft van  $\sim 200$   $\mu\text{m}$ )
- Pincet of forceps
- Stopwatch of timer
- Vloeibare-stikstof tank (dewar of piepschuimen container met deksel, volume van 1-2 l)
- Vloeibare stikstof (volume dat voldoende is om een diepte van 4 inch te verkrijgen in de tank)

### AANWIJZINGEN VOOR GEBRUIK

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu\text{l}$  voor het vitrificatieprotocol voor oöcyten  
of  
50  $\mu\text{l}$  voor het vitrificatieprotocol voor embryo's
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu\text{l}$  voor beide vitrificatieprotocollen
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu\text{l}$  voor het vitrificatieprotocol voor oöcyten

## VITRIFICATIEPROTOCOL:

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

1. Breng de te gebruiken hoeveelheid van ES, VS en WS op kamertemperatuur (20-27 °C).  
NB: De flacons met ES, VS en WS mogen in hun geheel niet herhaaldelijk op kamertemperatuur worden gebracht wanneer telkens slechts een deel van de oplossing nodig is. Het is beter om de te gebruiken hoeveelheid te verdelen in kleinere hoeveelheden en de flacons na het verdelen opnieuw bij 2-8 °C te plaatsen. Washing NX (WS) wordt gebruikt voor vitrificatie van oöcyten.
2. Vul de vloeibare-stikstof tank met vloeibare stikstof (LN<sub>2</sub>) – voldoende om een diepte van 4 inch te verkrijgen of om het cryobuisje op de cryohouder volledig onder te dompelen – en plaats de tank nabij de microscoop. Breng een cryobuisje of beker (zonder dop) in de klem op de bodem van een cryohouder in en dompel deze onder in de vloeibare stikstof ter voorbereiding van bewaring van de gevitrificeerde monsters.
3. Bepaal het aantal monsters voor vitrificatie.
4. Label elke steriele petrischaal (of deksel) en bewaarhulpmiddel voor cryobuisjes met de nodige informatie.
5. Controleer het vitrificatiehulpmiddel zorgvuldig voordat u start met de procedure.
6. Keer vóór gebruik elke flacon met ES en VS voorzichtig om, zodat de inhoud gemengd wordt.
7. Prepareer als volgt de schaal met druppels van de oplossingen voor de vitrificatieprocedure:

### A. Vitrificatieprotocol voor OÖCYTEN (MI):

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

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

1. Pipetteer op aseptische wijze een druppel van 20 µl van WS, ES1 en ES2 dicht bij elkaar en ES3 op een omgekeerde deksel van een steriele petrischaal, zoals weergegeven in afbeelding 1, en plaats de schaal op de microscopie tafel:
  - één druppel WS van 20 µl
  - drie druppels van 20 µl (60 µl in totaal) van ES (ES1, ES2, ES3)
2. Neem de kweeschaal met MI oöcyten uit de incubator en controleer de kwaliteit van de monsters onder de microscoop. Selecteer, indien mogelijk, alleen de oöcyt(en) in MI-fase van de beste kwaliteit.  
VOORZICHTIG: Beperk tijdens het equilibreren in de WS-, ES- en VS-druppels de blootstelling van monsters aan licht tot het minimum.
3. Breng de oöcyt(en) (maximaal 2 tegelijk) met een minimaal volume medium over van de kweeschaal (in de incubator) in de druppel WS van 20 µl gedurende één minuut.
4. Meng de druppel WS met ES1 (zie afbeelding 1, pijl 1) met de punt van de transferpipet en laat de twee oplossingen vanzelf mengen gedurende 2 minuten.
5. Meng vervolgens de druppel ES2 (pijl 2) met de eerder gemengde druppels en wacht 2 minuten.
6. Breng de oöcyt(en) met een minimaal volume oplossing over van de gemengde druppel naar de druppel ES3 gedurende 6-10 minuten.

NB: Het equilibreren van oöcyten in ES3 is voltooid wanneer de dikte van de zona pellucida en van de perivitelline ruimte gelijk is. De oöcyt(en) zet(ten) zich doorgaans binnen 3 minuten neer op de bodem van de druppel.

7. Pipetteer, tijdens het equilibreren in ES3, op aseptische wijze één (1) druppel van 50 µl VS voordat de het equilibreren voltooid is en prepareer het geselecteerde vitrificatiehulpmiddel voor het laden (afbeelding 2).
8. De volgende stappen (9-13) moeten binnen 80-110 seconden voltooid zijn.  
VOORZICHTIG: Blootstelling van monsters aan VS moet beperkt worden om cytotoxiciteit te voorkomen. Monsters hebben de neiging te zweven in VS. Daarom moet de focus via de microscoop worden aangepast voor continue visualisatie tijdens blootstelling en moet de punt van de transferpipet dichtbij worden gehouden, zodat overbrenging tussen druppels snel kan plaatsvinden. Zie afbeelding 2.
9. Spoel en vul de punt van de transferpipet met VS net voordat het equilibreren in ES voltooid is, zuig het (de) monster(s) met een minimaal volume ES op in de punt van de pipet en breng het (ze) over in de druppel VS gedurende 50-60 seconden. Laat de oöcyten op de bodem van VS los. Bij het loslaten zullen de oöcyten naar de bovenkant van VS zweven. Om te verzekeren dat volledig is gespoeld met VS, beweegt u de oöcyten voorzichtig opnieuw naar het midden van de bodem van VS door te pipetteren.

Tijdens dit proces worden de oöcyten gedehydrateerd en gaan ze opnieuw zweven.

10. Laad en verzegel het vitrificatiehulpmiddel volgens de instructies van de fabrikant.
11. Plaats het vitrificatiehulpmiddel van eigen keuze in het in LN<sub>2</sub> ondergedompelde, gevulde cryobuisje of de beker (op de cryohouder) - zie afbeelding 3. Doe de dop op het cryobuisje (of de beker) of bevestig het ondersteboven op een ander cryobuisje, zonder dop, om het gevitrificeerde hulpmiddel in vloeibare stikstof te kunnen plaatsen.
12. Breng de tank met LN<sub>2</sub> dicht bij de LN<sub>2</sub>-cryovriezer en breng de cryohouder met inhoud over naar de cryovriezer voor langdurige bewaring.

### B. Vitrificatieprotocol voor EMBRYO'S (PN tot blastocyst):

1. Pipetteer op aseptische wijze één (1) druppel ES van 50 µl op een omgekeerde deksel van een petrischaal (afbeelding 4).
2. Neem de kweeschaal met embryo('s) uit de incubator en controleer de kwaliteit van het (de) monster(s) onder de microscoop. Selecteer voor vitrificatie, indien mogelijk, het (de) embryo('s) van de beste kwaliteit.



3. Breng voorzichtig het (de) monster(s) (maximaal twee tegelijk) met een minimaal volume medium over van de kweeschaal naar de druppel ES en start de timer.  
Embryo's moeten langzaam equilibreren in de druppel ES middels vrije val gedurende 6-10 minuten.  
OPMERKING 1: Het monster zal krimpen en daarna geleidelijk opnieuw zijn oorspronkelijke grootte aannemen, wat erop duidt dat het equilibreren voltooid is.  
VOORZICHTIG: Beperk tijdens het equilibreren in de ES- en VS-druppels de blootstelling van monsters aan licht tot het minimum.
4. Pipetteer, tijdens dit equilibreren in ES, op aseptische wijze één (1) druppel VS-oplossing van 50 µl, zoals weergegeven in afbeelding 4, en prepareer het gekozen vitrificatiehulpmiddel voor het laden.
5. Spoel en vul de punt van de transferpipet met VS net voordat het equilibreren in ES voltooid is, zuig het (de) monster(s) met een minimaal volume ES op in de punt van de pipet en breng het (ze) over in de druppel VS gedurende 30 seconden. Laat de embryo's op de bodem van VS los. Bij het loslaten zullen de embryo's naar de bovenkant van VS zweven. Om te verzekeren dat volledig is gespeld met VS, brengt u de embryo's voorzichtig opnieuw naar het midden van de bodem van VS door te pipetteren.  
OPMERKING 2: Tijdens dit proces worden de embryo's gedehydrateerd en gaan ze opnieuw zweven.
6. Laad en verzegel het vitrificatiehulpmiddel volgens de instructies van de fabrikant.
7. Plaats het gevitrificeerde vitrificatiehulpmiddel van eigen keuze in het in LN<sub>2</sub> ondergedompelde, gevulde cryobuisje of de beker (of de cryohouder) (zie afbeelding 3). Doe de dop op het cryobuisje (of de beker) of bevestig het ondersteboven op een ander cryobuisje, zonder dop, om het gevitrificeerde hulpmiddel in vloeibare stikstof te kunnen plaatsen.
8. Breng de tank met LN<sub>2</sub> dicht bij de LN<sub>2</sub>-cryovriezer en breng de cryohouder met inhoud over naar de cryovriezer voor langdurige bewaring.

Voor aanvullende informatie over het gebruik van deze producten dienen alle laboratoria hun eigen laboratoriumprocedures en -protocollen te raadplegen die speciaal zijn ontwikkeld en geoptimaliseerd voor uw individueel medisch programma.

### INSTRUCTIES VOOR BEWARING; STABILITEIT

Bewaar de ongeopende flacons gekoeld bij 2 °C tot 8 °C. Wanneer Vit Kit - Freeze NX-oplossingen worden bewaard volgens de instructies, zijn ze stabiel tot aan de houdbaarheidsdatum die op het etiket van de flacons is vermeld.

Gebruik media niet langer dan veertien (14) dagen nadat de containers geopend zijn.

Aangezien het product menselijk bronmateriaal bevat, kunnen er zich tijdens bewaring (vaste) deeltjes vormen. Deze (vaste) deeltjes hebben voor zover bekend geen invloed op de prestaties van het product.

### VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Dit hulpmiddel is bedoeld voor gebruik door medewerkers die opgeleid zijn in geassisteerde voortplantingsprocedures. Tot deze procedures behoort het gebruik waarvoor dit hulpmiddel bedoeld is.

De instelling waarin dit hulpmiddel wordt gebruikt, is verantwoordelijk voor het behoud van de traceerbaarheid van het product en moet, waar van toepassing, voldoen aan de nationale voorschriften met betrekking tot traceerbaarheid.

Gebruik geen flacon met een oplossing die beschadigd is, lekt, (vaste) deeltjes bevat of troebel is. Voer het product af volgens de geldende voorschriften.

Gebruik aseptische methoden om besmettingsproblemen te vermijden.

Momenteel wijst onderzoeksliteratuur uit dat de lange-termijneffecten van vitrificatie op oöcyten en embryo's onbekend blijven.

Gebruik geen flessen waarvan de steriele verpakking beschadigd is.

**EU:** Tot de standaardmaatregelen ter voorkoming van infecties door gebruik van geneesmiddelen die bereid zijn uit menselijk bloed of plasma behoren de selectie van donors, de screening van individuele donaties en plasmapools op specifieke infectiemarkers en de toepassing van effectieve productiestappen voor de inactivatie/verwijdering van virussen. Desondanks kan bij toediening van geneesmiddelen die zijn bereid uit menselijk bloed of plasma, de mogelijke overdracht van infectieuze organismen niet geheel worden uitgesloten. Dit geldt ook voor onbekende of toekomstige virussen en andere pathogenen. Er zijn geen meldingen ontvangen van bewezen virusoverdrachten bij albumine dat met behulp van gevestigde processen volgens de specificaties van Europese Farmacopee is gefabriceerd. U wordt dringend aangeraden om telkens wanneer een patiënt kweekmedia voor voortplantingsprocedures van FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. krijgt toegediend de naam en het partijnummer van het product te noteren, zodat er een link blijft bestaan tussen de patiënt en de productpartij.

**VS:** Dit product bevat menselijk serumalbumine (HSA). Het menselijke bronmateriaal dat wordt gebruikt bij de vervaardiging van dit product is getest met door de Amerikaanse Inspectiedienst voor Voedings- en Geneesmiddelen (FDA) goedgekeurde kits. Daaruit is gebleken dat het niet reageert op de antistoffen voor hepatitis C (HCV) en antistoffen voor het menselijk immuundeficiëntievirus (HIV). Geen enkele testmethode biedt echter volledige zekerheid dat producten afkomstig van menselijke bronnen niet besmettelijk zijn. Ga met al het menselijk bronmateriaal om alsof het infecties kan overdragen en neem universele voorzorgsmaatregelen. Donors van het bronmateriaal zijn ook gecontroleerd op de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (CJD).

### CONTRA-INDICATIE

Het product bevat gentamicinesulfaat. Passende voorzorgsmaatregelen dienen te worden genomen om te verzekeren dat de patiënt niet gevoelig is voor dit antibioticum.



UE — UWAGA: Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych.

## PRZEZNACZENIE

Zestaw Vit Kit - Freeze NX jest przeznaczony do użytku w procedurach wspomaganego rozrodu, które obejmują wtryfikację i przechowywanie ludzkich oocytów (MI), zygot, w których obecne są przedjądrza (PN), do 3. dnia bruzdkowania w rozwoju zarodkowym oraz zarodków w stadium blastocysty.

## OPIS WYROBU

Roztwór **Equilibration NX-ES** to roztwór pożywki Continuous Single Culture Medium (CSCM) buforowany podwójnie (HEPES i MOPS), zawierający siarczan gentamycyny, 7,5-procentowy (stęż. obj.) DMSO, 7,5-procentowy (stęż. obj.) glikol etylenowy i 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek Dextran Serum Supplement (DSS).

Roztwór **Vitrification NX-VS** to roztwór pożywki CSCM buforowany podwójnie (HEPES i MOPS), zawierający siarczan gentamycyny, 15-procentowy (stęż. obj.) DMSO, 15-procentowy (stęż. obj.) glikol etylenowy, 20-procentowy (stęż. obj.) dodatek DSS i roztwór trehalozy w stężeniu 0,5 M.

Roztwór **Washing NX-WS** to roztwór pożywki CSCM buforowany podwójnie (HEPES i MOPS), zawierający siarczan gentamycyny i 20-procentowy dodatek DSS.

DSS to dodatek białkowy, w którego skład wchodzi 50 mg/ml albuminy surowicy ludzkiej (HSA) o przeznaczeniu terapeutycznym i 20 mg/ml dekstranu. DSS jest używany w zestawie Vit Kit – Freeze NX w stężeniu 20-procentowym (stęż. obj.), co daje końcowe łączne stężenie HSA równe 10 mg/ml i dekstranu równe 4 mg/ml.

Roztworów tych należy używać w odpowiedniej kolejności zgodnie z protokołem wtryfikacji, który obejmuje sekwencyjne przeniesienie oocytów/zarodków do mikrokrpelek.

## SKŁAD

### Sole i jon

Fosforan potasu  
Chlorek sodu  
Chlorek potasu  
Siarczan magnezu  
Chlorek wapnia

### Aminokwasy

L-arginina  
Glicyna  
L-histydyna  
L-lizyna  
L-prolina  
L-tyrozyna  
L-alanina  
Kwas L-asparaginowy  
L-asparagina  
Kwas L-glutaminowy  
L-izoleucyna  
L-leucyna  
L-alanilo-L-glutamina  
L-metionina

L-fenylalanina

L-seryna  
L-treonina  
L-tryptofan  
L-walina  
L-cysteina

### Substraty energetyczne

Dekstroza  
Pirogryonian sodu  
Mieczan sodu

### Bufor

Wodorowęglan sodu  
HEPES  
MOPS

### Antyoksydanty

Cytrynian sodu  
EDTA

### Białko

Albumina surowicy ludzkiej,  
HSA

### Krioprotektanty

Dekstran  
Trehaloza  
Glikol etylenowy  
Dimetylosulfotlenek

## ZAPEWNIENIE JAKOŚCI

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

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

- Badanie pod kątem obecności endotoksyn metodą Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/ml); Farmakopea Amerykańska (USP), rozdział Bacterial Endotoxins <85> i Farmakopea Europejska (Ph. Eur.), monografia 2.6.14
- Badanie na zarodku mysim (jednokomórkowym) (rozwój  $\geq 80\%$  spośród jednokomórkowych zarodków w stadium blastocysty)
- Badanie sterylności, zgodnie z najnowszym badaniem sterylności wg Farmakopei Amerykańskiej (USP) <71> oraz monografii Farmakopei Europejskiej (Ph. Eur.) 3.2 (wymagania spełnione)

Wszystkie wyniki są notowane na swoistym dla danej serii Świadectwie analizy, które jest dostępne na żądanie.

## MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Wybrany wyrób do wtryfikacji
- Sterylne szalki Petriego (50 X 9 mm, Falcon 351006 lub odpowiednik)
- Krioprobówki (4,5 ml) lub kubki i preły kriogeniczne
- Hialuronidaza (nr katalogowy 90101) do wtryfikacji oocytów
- Jednorazowe rękawiczki
- Pipety transferowe (pipety szklane lub końcówki do mikropipet o wewnętrznej średnicy końcówki ~200  $\mu$ m)
- Pęseta lub szczypce
- Stoper lub minutnik
- Zbiornik na ciekły azot (dewar lub pojemnik styropianowy z wieczkiem, objętość 1–2 l)
- Ciekły azot (objętość wystarczająca do napełnienia zbiornika do głębokości 4 cali)

## INSTRUKCJA UŻYCIA

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60 µl w przypadku protokołu wityfikacji oocytów lub  
50 µl w przypadku protokołu wityfikacji zarodków
- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl niezależnie od stosowanego protokołu wityfikacji
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl w przypadku protokołu wityfikacji oocytów

## PROTOKÓŁ WITYFIKACJI:

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

1. Doprowadzić odpowiednie objętości roztworów ES, VS i WS do temperatury pokojowej (20–27 °C).

UWAGA: Należy unikać wielokrotnego doprowadzania całej zawartości fiolek z roztworami ES, VS i WS do temperatury pokojowej, gdy za każdym razem potrzebna jest tylko porcja każdego roztworu. Lepszym rozwiązaniem jest wydzielenie z ich zawartości porcji, która ma zostać użyta, a następnie umieszczenie fiolek z powrotem w temperaturze 2–8 °C. Roztwór Washing NX (WS) jest używany do wityfikacji oocytów.

2. Nappełnić zbiornik na ciekły azot ciekłym azotem (LN<sub>2</sub>) — objętością wystarczającą do napelnienia zbiornika do głębokości 4 cali lub całkowitego zanurzenia krioprobówki znajdującej się na przecie — i umieścić go w pobliżu mikroskopu. Przymocować krioprobówkę lub kubek (bez zatyczki) do dolnego zacisku pręta kriogenicznego i zanurzyć w ciekłym azocie w celu przygotowania do przechowywania oocytów/zarodków po wityfikacji.

3. Określić liczbę oocytów/zarodków poddawanych wityfikacji.

4. Oznaczyć odpowiednimi danymi każdą sterylną szalkę Petriego (lub wieczko) oraz wyrób do przechowywania próbek w warunkach kriogenicznych.

5. Przed rozpoczęciem procedury uważnie obejrzyć wyrób stosowany do wityfikacji.

6. Przed użyciem delikatnie odwrócić każdą fiolkę roztworu ES i VS, aby wymieszać zawartość fiolek.

7. Przygotować szalkę z kropelkami roztworów do procedury wityfikacji zgodnie z poniższym opisem:

### A. Protokół wityfikacji OOCYTÓW (MII):

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

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

1. W sposób aseptyczny nanieść kropelki o objętości 20 µl na odwrócone wieczko sterylnej szalki Petriego — kropelki WS, ES1 i ES2 w niewielkiej odległości od siebie oraz kropelkę ES3 — zgodnie z Ryc. 1, a następnie umieścić szalkę na stoliku mikroskopowym:
  - jedna kropelka roztworu WS o objętości 20 µl
  - trzy kropelki roztworu ES (ES1, ES2, ES3) o objętości 20 µl każda (łącznie 60 µl)

2. Wyjąć naczynie hodowlane zawierające oocyty w stadium MII z inkubatora i sprawdzić ich jakość pod mikroskopem. Jeśli jest to możliwe, wybrać jedynie oocyty w stadium MII charakteryzujące się najlepszą jakością.

PRZESTROGA: Podczas równoważenia oocytów w kropelkach roztworów WS, ES i VS należy zminimalizować ich ekspozycję na światło.

3. Przenieść oocyty (maksymalnie 2 jednocześnie) w minimalnej objętości pożywki z naczynia hodowlanego (z inkubatora) do kropelki roztworu WS o objętości 20 µl i pozostawić na jedną minutę.

4. Połączyć kropelkę roztworu WS z kropelką ES1 (patrz Ryc. 1, strzałka 1), używając końcówki pipety transferowej, i pozostawić na 2 minuty, aby umożliwić samoistne wymieszanie się obu roztworów.

5. Następnie połączyć kropelkę ES2 (strzałka 2) z uprzednio połączonymi kropelkami i pozostawić na 2 minuty.

6. Przenieść oocyty w minimalnej objętości roztworu uzyskanego w wyniku połączenia kropelek do kropelki ES3 i pozostawić na 6–10 minut.

Uwaga: równoważenie oocytów w kropelce ES3 można uznać za zakończone, gdy grubość osłonki przejrzystej będzie równa przestrzeni okołołótkowej. Oocyty zwykle osiadają na dnie kropli w ciągu 3 minut.

7. Przed zakończeniem równoważenia oocytów w kropelce ES3 należy w sposób aseptyczny nanieść jedną (1) kropelkę roztworu VS o objętości 50 µl i przygotować wybrany wyrób do wityfikacji w celu jego załadowania (Ryc. 2).

8. Poniższe kroki (9–13) należy wykonać w ciągu 80–110 sekund.

PRZESTROGA: Należy ograniczyć ekspozycję oocytów na roztwór VS, aby uniknąć cytotoksycznego działania roztworu. Oocyty mają tendencję do unoszenia się w roztworze VS, dlatego należy dostosować ostrość mikroskopu, aby zapewnić ciągłą obserwację oocytów podczas ekspozycji na roztwór, i trzymać końcówkę pipety transferowej w pobliżu, aby zapewnić szybkie przenoszenie oocytów pomiędzy kroplami. Patrz Ryc. 2.

9. Bezpośrednio przed zakończeniem równoważenia oocytów w roztworze ES przepłukać i napelnić końcówkę pipety transferowej roztworem VS, a następnie pobrać oocyty w minimalnej objętości roztworu ES do końcówki pipety i przenieść do kropelki roztworu VS na 50–60 sekund. Oocyty należy podawać na dno kropelki VS. Podczas podawania oocytów wypłyną one na wierzch kropelki VS. Aby zagwarantować dokładne przepłukanie oocytów roztworem VS, należy ostrożnie przesunąć je z powrotem na środek dna kropelki VS, używając pipety.

Podczas tego procesu dojdzie do odwodnienia oocytów, co spowoduje, że ponownie wypłyną one na powierzchnię.

10. Załadować i zamknąć wyrób do wityfikacji zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta.

11. Umieścić wyrób do wityfikacji zawierający oocyty w zanurzonej krioprobówce lub zanurzonym kubku (na przecie kriogenicznym) wypełnionej(-ym) LN<sub>2</sub>, patrz Ryc. 3. Zamknąć zatyczką krioprobówkę (lub kubek) lub przymocować do góry dnem inną niezamkniętą krioprobówkę w celu zabezpieczenia wyrobu do wityfikacji w ciekłym azocie.
12. Umieścić zbiornik na LN<sub>2</sub> w pobliżu kriozamrażarki z LN<sub>2</sub>, a następnie przenieść pręt kriogeniczny z jego zawartością do kriozamrażarki w celu długoterminowego przechowywania.

#### **B. Protokół wityfikacji ZARODKÓW (od zygot, w których obecne są PN, do zarodków w stadium blastocysty):**

1. W sposób aseptyczny nanieść jedną kroplę ES o objętości 50 µl na odwrócone wieczko szalki Petriego (Ryc. 4).
2. Wyjąć naczynie hodowlane zawierające zarodki z inkubatora i sprawdzić ich jakość pod mikroskopem. Jeśli jest to możliwe, wybrać do wityfikacji jedynie zarodki charakteryzujące się najlepszą jakością.
3. Ostrożnie przenieść zarodki (maksymalnie 2 jednocześnie) w minimalnej objętości pożywki z naczynia hodowlanego (z inkubatora) do kroplek roztworu ES i uruchomić minutnik.

Równoważenie zarodków w kropelce ES powinno przebiegać powoli; zarodki powinny swobodnie opadać przez 6–10 minut.

**UWAGA 1:** Zarodek skurczy się, a następnie stopniowo wróci do pierwotnego rozmiaru, co będzie oznaczać ukończenie równoważenia.

**PRZESTROGA:** Podczas równoważenia zarodków w kropelkach roztworów ES i VS należy zminimalizować ekspozycję na światło.

4. Podczas równoważenia zarodków w kropelce roztworu ES należy w sposób aseptyczny nanieść jedną kroplę roztworu VS o objętości 50 µl, tak jak to przedstawiono na Ryc. 4, i przygotować wybrany wyrób do wityfikacji w celu jego załadowania.
5. Bezpośrednio przed zakończeniem równoważenia zarodków w roztworze ES przepłukać i napełnić końcówkę pipety transferowej roztworem VS, a następnie pobrać zarodki w minimalnej objętości roztworu ES do końcówki pipety i przenieść je do kroplek roztworu VS na co najmniej 30 sekund. Zarodki należy podawać na dno kroplek VS. Podczas podawania zarodków wypłyną one na wierzch kroplek VS. Aby zagwarantować dokładne przepłukanie zarodków roztworem VS, należy ostrożnie przesunąć je na środek dna kroplek VS, używając pipety.

**UWAGA 2:** Podczas tego procesu dojdzie do odwodnienia zarodków, co spowoduje, że ponownie wypłyną one na powierzchnię.

6. Załadować i zamknąć wyrób do wityfikacji zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta.
7. Umieścić wyrób do wityfikacji w zanurzonej krioprobówce lub zanurzonym kubku (na przecie kriogenicznym) wypełnionej(-ym) LN<sub>2</sub>, patrz Ryc. 3. Zamknąć zatyczką krioprobówkę (lub kubek) lub przymocować do góry dnem inną niezamkniętą krioprobówkę w celu zabezpieczenia wyrobu do wityfikacji w ciekłym azocie.
8. Umieścić zbiornik na LN<sub>2</sub> w pobliżu kriozamrażarki z LN<sub>2</sub>, a następnie przenieść pręt kriogeniczny z jego zawartością do kriozamrażarki w celu długoterminowego przechowywania.

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

#### **INSTRUKCJE DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I STABILNOŚCI**

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

Po otwarciu fiolek należy użyć pożywki w ciągu czterech dni (14) dni.

Ze względu na to, że w produkcie obecny jest materiał pochodzenia ludzkiego, podczas przechowywania produktu mogą wytrącić się cząstki stałe. Nie stwierdzono, aby ten typ cząstek stałych negatywnie wpływał na właściwości produktu.

#### **ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA**

Wyrób ten jest przeznaczony do użytku przez personel przeszkolony w procedurach wspomaganego rozrodu. Procedury te obejmują sposób wykorzystania wyrobu zgodnie z jego przeznaczeniem.

Ośrodek użytkownika, w którym stosowany jest ten wyrób, odpowiada za zachowanie identyfikowalności produktu i musi postępować zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi identyfikowalności, jeśli mają one zastosowanie.

Nie używać żadnej folki z roztworem, która wygląda na uszkodzoną, przecieka oraz jeśli w roztworze obecne są cząstki stałe lub zmętnienie. Zutilizować produkt zgodnie z obowiązującymi przepisami.

W celu uniknięcia problemów związanych z zanieczyszczeniem z produktem należy obchodzić się, stosując techniki aseptyczne.

Z dostępnej obecnie literatury naukowej wynika, że wciąż nie jest znany długoterminowy wpływ wityfikacji na oocyty i zarodki.

Nie korzystać z butelek, w przypadku których sterylne opakowanie zostało naruszone.

**UE:** Standardowe środki zapobiegania zakażeniem wynikającym z używania produktów leczniczych przygotowanych z ludzkiej krwi lub osocza obejmują dobór dawców, badania przesiewowe pojedynczych donacji krwi i pul osocza pod względem swoistych znaczników zakażeń oraz stosowanie skutecznych kroków w produkcji w celu inaktywacji/usuwania wirusów. Mimo to podczas podawania produktów leczniczych wyprodukowanych z krwi lub osocza ludzkiego nie można całkowicie wykluczyć możliwości przeniesienia czynników zakaźnych. Odnosi się to także do nieznanymi lub rozwijających się wirusów bądź innych patogenów. Nie ma żadnych doniesień o potwierdzonym przeniesieniu wirusów dla albuminy wytwarzanej w ustalonym procesie, zgodnie ze specyfikacjami Farmakopei Europejskiej. Zdecydowanie zalecane jest, by każdorazowo — podczas podawania pacjentce produktów firmy FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. związanych z pożywkami do hodowli komórek rozrodczych — zapisać nazwę i numer serii produktu, aby zachować powiązanie pomiędzy pacjentką a serią produktu, który otrzymała.

USA: Ten produkt zawiera albuminę surowicy ludzkiej (HSA). Materiał pochodzenia ludzkiego użyty do wyprodukowania tego produktu był testowany przy użyciu zestawów licencjonowanych przez Agencję ds. Żywności i Leków oraz określono, że nie wykazuje on reakcji na przeciwciała przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV) ani na przeciwciała przeciw ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV). Jednakże żadna z metod testowych nie oferuje całkowitej pewności, że produkty pochodzenia ludzkiego nie są zakaźne. Ze wszystkimi produktami pochodzenia ludzkiego należy postępować tak, jakby mogły przenieść one zakażenie, stosując uniwersalne środki ostrożności. Dawcy tych materiałów źródłowych zostali także przebadani na obecność choroby Creutzfeldta-Jacoba (CJD).

#### **PRZECIWWSKAZANIE**

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

## ROMÂNĂ

**AVERTIZARE UE:** Numai pentru uz profesional.

### ÎNTREBUINȚARE

Vit Kit - Freeze NX este destinat utilizării în proceduri de reproducere asistată pentru vitrificarea și depozitarea ovocitelor umane (MII), a zigotilor pronucleari (PN) pentru embrioni în stadiul de clivaj până în ziua 3 și embrioni în stadiul de blastocist.

### DESCRIEREA DISPOZITIVULUI

**Equilibration NX-ES** este o soluție dublu tamponată (HEPES și MOPS) de mediu Continuous Single Culture (CSCM) care conține sulfat de gentamicină, 7,5% (v/v) atât de DMSO, cât și de etilenglicol și 20% (v/v) de Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX-VS** este o soluție dublu tamponată (HEPES și MOPS) de CSCM care conține sulfat de gentamicină, 15% (v/v) atât de DMSO, cât și de etilenglicol, 20% (v/v) de DSS și 0,5 M de trehaloză.

**Washing NX-WS** este o soluție dublu tamponată (HEPES și MOPS) de CSCM care conține sulfat de gentamicină și 20% de DSS.

DSS este un supliment proteic care constă în 50 mg/ml de albumină serică umană (HSA) de puritate terapeutică și 20 mg/ml de dextran. DSS este utilizat la 20% (v/v) în Vit Kit – Freeze NX pentru o concentrație finală de 10 mg/ml de HSA și 4 mg/ml de dextran.

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

### COMPOZIȚIE

#### Săruri și ioni

Fosfat de potasiu  
Clorură de sodiu  
Clorură de potasiu  
Sulfat de magneziu  
Clorură de calciu

#### Aminoacizi

L-Arginină  
Glicină  
L-Histidină  
L-Lizină  
L-Prolină  
L-Tirozină  
L-Alanină  
L-Acid aspartic  
L-Asparagină  
L-Acid glutamic  
L-Izoleucină  
L-Leucină  
L-Alanil-L-Glutamină  
L-Metionină

L-Fenilalanină  
L-Serină  
L-Treonină  
L-Triptofan  
L-Valină  
L-Cistină

#### Substraturi energetice

Dextroză  
Piruvat de sodiu  
Lactat de sodiu

#### Soluție tampon

Carbonat acid de sodiu  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidanți

Citrat de sodiu  
EDTA

#### Proteină

Albumină serică umană, HSA

#### Crioprotectori

Dextran  
Trehaloză  
Etilen-glicol  
Dimetilsulfoxid

#### Antibiotice

Sulfat de gentamicină

### ASIGURAREA CALITĂȚII

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

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

- Endotoxină prin metoda Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/mL) prin testul endotoxinelor bacteriene prevăzut de Farmacopeea Americană <85> și Farmacopeea Europeană 2.6.14
- Analiza embrionului de soarece (o celulă) ( $\geq 80\%$  blastocist expandat)
- Sterilitatea prin testul de sterilitate actual prevăzut de Farmacopeea Americană <71>, Farmacopeea Europeană 3.2 (reușit)

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

### MATERIALE CARE SUNT NECESARE, DAR NU SUNT INCLUSE:

- Dispozitivul de vitrificare ales
- Vase Petri sterile (50 X 9 mm, Falcon 351006 sau echivalent)
- Criotuburi (4,5 ml) sau cupe și tije Cryocane
- Hialuronidază (Catalog #90101) pentru vitrificarea ovocitelor
- Mănuși de unică folosință
- Pipete de transfer (pipete Pasteur din sticlă sau vârfuri de micropipete cu un diametru interior al vârfului de ~200  $\mu$ m)
- Clește sau pensetă
- Cronometru sau temporizator
- Rezervor de azot lichid (recipient Dewar sau din polistiren cu capac, volum 1-2 l)
- Azot lichid (volum suficient pentru a obține o adâncime de 4 inchii în rezervor)

### INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Componente Vit Kit – Freeze NX (la fiecare aplicație):

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l pentru Protocolul de vitrificare a ovocitelor sau  
50  $\mu$ l pentru Protocolul de vitrificare a embrionilor
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ l pentru oricare dintre cele două protocoale de vitrificare
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ l pentru Protocolul de vitrificare a ovocitelor

## PROTOCOLUL DE VITRIFICARE:

NOTĂ: Procedurile se vor realiza la temperatura camerei (20-27°C). NU folosiți placa încălzită a microscopului pentru procedurile de mai jos. AVERTIZARE: Reduceți la minimum expunerea specimenului la lumină în timpul echilibrării în soluțiile ES și VS.

1. Aduceți la temperatura camerei (20-27°C) cantitatea de ES, VS și WS pe care o veți folosi.

NOTĂ: Evitați aducerea la temperatura camerei în mod repetat a fiolilor întregi de ES, VS și WS, când este nevoie de o parte din soluție de fiecare dată. Este mai bine să repartizați în părți alicote cantitatea pe care o veți folosi și să reduceți fiolile la 2-8°C imediat după repartizarea în părți alicote. Washing NX (WS) este folosită pentru vitrificarea ovocitelor.

- Umpleți rezervorul de azot lichid cu azot lichid (LN<sub>2</sub>) – suficient pentru a obține o adâncime de 4 inchii sau pentru a scufunda criotubul complet pe tijă – și așezați-l aproape de microscop. Atașați un criotub sau o cupă (fără capac) de clema de jos a tijei Cryocane și scufundați în azot lichid în pregătirea pentru depozitarea speciemenelor vitrificate.
- Stabiliți câte specieme trebuie vitrificate.
- Etichetați fiecare vas Petri steril (sau capac) și dispozitivul de depozitare criogenică cu informațiile necesare.
- Verificați cu atenție dispozitivul de vitrificare înainte de a începe procedura.
- Răsturnați ușor fiecare fiolă de ES și VS pentru a amesteca conținutul înainte de utilizare.
- Pregătiți vasul cu picături de soluții pentru Procedura de vitrificare, după cum urmează:

### A. Protocolul de vitrificare a OVOCITELOR (MI):

NOTA 1: Ovocitele recoltate sunt denudate cu hialuronidază pentru a confirma că sunt MI.

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

- Distribuiți aseptice câte o picătură de 20 μl de WS, ES1 și ES2 aproape una de cealaltă și de ES3 pe un capac întors al unui vas Petri steril, așa cum se arată în figura 1, și așezați vasul pe placa microscopului:
  - o picătură de 20 μl de WS
  - trei picături de 20 μl (60 μl în total) de ES (ES1, ES2, ES3)
- Scostați vasul de cultură care conține ovocitele MI din incubator și verificați calitatea speciemenelor la microscop. Dacă este posibil, selectați doar ovocitul/ovocitele din stadiul MI de cea mai bună calitate.  
AVERTIZARE: Reduceți la minimum expunerea specimenului/speciemenelor la lumină în timpul echilibrării în picăturile de WS, ES și VS.
- Transferați ovocitele (maximum 2 în același timp) cu un volum minim de mediu din vasul de cultură (în incubator) în picătura de 20 μl de WS și lăsați un minut.
- Înglobați picătura de WS în ES1 (vezi figura 1, săgeata 1) cu vârful unei pipete de transfer și permiteți amestecul spontan al celor două soluții timp de 2 minute.
- Apoi înglobați picătura de ES2 (săgeata 2) în picăturile înglobate anterior și lăsați timp de 2 minute.
- Transferați ovocitul/ovocitele cu un volum minim de soluție din picătura înglobată în picătura de ES3 și lăsați timp de 6-10 minute.  
Notă: echilibrarea ovocitului/ovocitelor în ES3 este completă atunci când grosimile zonei pellucida și spațiului perivitelin sunt egale. În mod normal, ovocitul/ovocitele se vor depune la fundul picăturii în 3 minute.
- În timpul perioadei de echilibrare în ES3, distribuiți aseptice o (1) picătură de 50 μl de VS înainte de finalizarea echilibrării și pregătiți dispozitivul de vitrificare ales pentru încărcare (figura 2).
- Următorii pași (9-13) trebuie efectuați în 80-110 secunde.  
AVERTIZARE: Expunerea speciemenelor la VS trebuie limitată pentru prevenirea citotoxicității. Specimenul/speciemenele tind să plutească în VS, așa că trebuie să ajustați focusul microscopului pentru a avea o vizualizare continuă în timpul expunerii și țineți vârful pipetei de transfer în apropiere pentru a asigura transferul rapid între picături. Consultați figura 2.
- Clătiți și umpleți vârful pipetei de transfer cu VS imediat înainte ca echilibrarea în ES să fie completă și extrageți specimenul/speciemenele cu un volum minim de ES în vârful pipetei și transferați-le în picătura de VS și lăsați-le timp de 50-60 de secunde. Descărcați ovocitele la fundul VS. Când faceți descărcarea, ovocitele vor pluti deasupra VS. Pentru a vă asigura că ați făcut o clătire completă cu VS, mutați ușor ovocitele la fund, în centrul VS, folosind pipeta.  
În cursul acestui proces, ovocitele se vor deshidrata și vor ajunge din nou să plutească.
- Încărcați și sigilați dispozitivul de vitrificare conform instrucțiunilor producătorului.
- Așezați specimenul/speciemenele vitrificate pe dispozitivul de vitrificare ales în criotubul sau cupa scufundate cu LN<sub>2</sub> (de pe tijă Cryocane) figura 3. Acoperiți criotubul (sau cupa) cu un capac sau uniți-l cu fața în jos cu un alt criotub fără capac pentru a fixa dispozitivul vitrificat în azot lichid.
- Mutați rezervorul cu LN<sub>2</sub> aproape de congelatorul criogenic cu LN<sub>2</sub> și transferați tijă Cryocane împreună cu conținutul său în congelatorul criogenic pentru depozitare pe termen lung.

### B. Protocolul de vitrificare a EMBRIONILOR (PN până la blastocist):

- Distribuiți aseptice o (1) picătură de 50 μl de ES pe un capac întors al unui vas Petri (vezi figura 4).
- Scostați vasul de cultură cu embrionul/embrionii din incubator și verificați calitatea specimenului/speciemenelor la microscop. Dacă este posibil, selectați doar embrionul/embrionii de cea mai bună calitate.
- Transferați cu atenție specimenul (maximum două în același timp) cu un volum minim de mediu din vasul de cultură în picătura de ES și porniți temporizatorul.  
Embrionii ar trebui să se echilibreze în picătura de ES ușor, prin cădere liberă, timp de 6-10 minute.  
NOTA 1: Specimenul se va contracta și apoi va reveni treptat la dimensiunea inițială, ceea ce arată că echilibrarea s-a finalizat.  
AVERTIZARE: Reduceți la minimum expunerea specimenului/speciemenelor la lumină în timpul echilibrării în picăturile de ES și VS.
- În timpul acestei perioade de echilibrare în ES, distribuiți aseptice o (1) picătură de 50 μl de soluție VS, așa cum se arată în figura 4 și pregătiți dispozitivul de vitrificare ales pentru încărcare.



5. Clătiți și umpleți vârful pipetei de transfer cu VS imediat înainte ca echilibrarea în ES să fie completă și extrageți specimenul/ speciemenele cu un volum minim de ES în vârful pipetei și transferați-le în picătura de VS și lăsați-le timp de minimum 30 de secunde. Descărcați embrionii la fundul VS. Când faceți descărcarea, embrionii vor pluti deasupra VS. Pentru a vă asigura că ați făcut o clătire completă cu VS, mutați ușor embrionii la fund, în centrul VS, folosind pipeta.  
NOTA 2: În cursul acestui proces, embrionii se vor deshidrata și vor ajunge din nou să plutească.
6. Încărcați și sigilați dispozitivul de vitrificare conform instrucțiunilor producătorului.
7. Așezați [embrionii] vitrificaliți pe dispozitivul de vitrificare ales în criotubul sau cupa scufundate cu LN<sub>2</sub> (pe tija Cryocane) - Figura 3. Acoperiți criotubul (sau cupa) cu un capac sau uniți-l cu fața în jos cu un alt criotub fără capac pentru a fixa dispozitivul vitrificat în azot lichid.
8. Mutați rezervorul cu LN<sub>2</sub> aproape de congelatorul criogenic cu LN<sub>2</sub> și transferați tija Cryocane împreună cu conținutul său în congelatorul criogenic pentru depozitare pe termen lung.

Pentru detalii suplimentare privind folosirea acestor produse, fiecare laborator trebuie să își consulte propriile proceduri și protocoale, care au fost elaborate și optimizate special pentru programul dvs. medical individual.

#### **INSTRUCȚIUNI PENTRU PĂSTRARE ȘI STABILITATE**

Păstrați fiiolele nedeschise refrigerate la temperaturi între 2 și 8 °C. Când sunt depozitate conform instrucțiunilor, soluțiile Vit Kit - Freeze NX sunt stabile până la data expirării indicată pe etichetele fiiolelor.

Nu folosiți mediile mai mult de paisprezece (14) zile odată ce recipientele au fost deschise.

Deoarece în produs este prezent material din surse umane, el poate forma o anumită cantitate de urme de particule în cursul depozitării. Nu se cunoaște ca aceste urme de particule să aibă efect asupra performanței produsului.

#### **PRECAUȚII ȘI AVERTISMENTE**

Acest dispozitiv este conceput pentru a fi utilizat de către personal instruit în proceduri de reproducere asistată. Aceste proceduri includ întrebuințarea pentru care este conceput acest dispozitiv.

Instituția care utilizează acest dispozitiv este responsabilă pentru menținerea trasabilității produsului și trebuie să respecte normele naționale referitoare la trasabilitate, când este cazul.

Nu utilizați fiole de soluție care prezintă deteriorări, scurgeri, urme de particule în suspensie, care este turbure. Eliminați produsul în conformitate cu reglementările aplicabile.

Pentru a evita problemele legate de contaminare, manevrați folosind tehnici aseptice.

În prezent, literatura de specialitate arată că efectele pe termen lung ale vitrificării asupra ovocitelor și embrionilor rămân necunoscute.

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

UE: Măsurile standard de prevenire a infecțiilor care apar din cauza folosirii produselor medicinale preparate din sânge uman sau plasmă umană presupun selectarea donatorilor, analizarea donațiilor individuale și a băncilor de plasmă pentru depistarea markerilor specifici de infecții și includerea unor etape de fabricație eficiente pentru anihilarea/eliminarea virusurilor. În ciuda acestora, când se administrează produse medicale preparate din sânge uman sau plasmă umană, posibilitatea de a se transmite agenți infecțioși nu poate fi exclusă în totalitate. Acest lucru este valabil și pentru virusurile necunoscute sau noi și alți agenți patogeni. Nu s-au raportat cazuri de transmitere dovedită de virusuri prin albumină fabricată prin procedee convenționale în conformitate cu specificațiile Farmacopeei Europene. Recomandăm insistent ca, de fiecare dată când se administrează unui pacient produse de tip medii de cultură pentru proceduri de reproducere FUJIFILM Irvine Scientific, Inc., să se consemneze numele și numărul de lot al produsului, pentru a menține o legătură între pacient și lotul produsului.

SUA: Acest produs conține albumină serică umană (HSA). Materialul din surse umane folosit la fabricarea acestui produs a fost testat cu ajutorul truselor autorizate de FDA (Food and Drug Administration - Agenția pentru alimente și medicamente) și s-a constatat că nu este reactiv la anticorpii împotriva virusului hepatitei C (HCV) și la anticorpii împotriva virusului imunodeficienței umane (HIV). Cu toate acestea, nicio metodă de testare nu oferă siguranța deplină că produsele derivate din surse umane nu sunt infecțioase. Manevrați toate materialele din surse umane ca și cum ar putea să transmită infecții, aplicând măsurile de precauție general valabile. Donatorilor de materiale sursă le-au fost efectuate analize și pentru depistarea bolii Creutzfeldt-Jakob (CJD).

#### **CONTRAINDICAȚII**

Produsul conține sulfat de gentamicină. Trebuie luate măsurile de precauție adecvate pentru a vă asigura că pacientul nu este alergic la acest antibiotic.



EU – OBS! Endast för professionellt bruk.

### AVSEDD ANVÄNDNING

Vit Kit – Freeze NX är avsedd att användas för procedurer för assisterad befruktning, för vitrifiering och lagring av humana oocyter (MII), prokärna-zygoter (PN) t.o.m. embryon i klyvningsfas dag 3 och embryon i blastocyststadium.

### PRODUKTBESKRIVNING

**Equilibration NX-ES** är en lösning som innehåller två buffertar (HEPES och MOPS) av Continuous Single Culture Medium (CSCM) innehållande gentamicinsulfat, 7,5 % (v/v) av såväl DMSO som etylenglykol, samt 20 % (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX-VS** är en lösning som innehåller två buffertar (HEPES och MOPS) av CSCM innehållande gentamicinsulfat, 15 % (v/v) av såväl DMSO som etylenglykol, 20 % (v/v) DSS samt 0,5 M trehalos.

**Washing NX-WS** är en lösning som innehåller två buffertar (HEPES och MOPS) av CSCM innehållande gentamicinsulfat och 20 % DSS.

DSS är en proteintillsats bestående av 50 mg/ml humant serumalbumin (HSA) av terapeutisk kvalitet samt 20 mg/ml dextran. DSS används vid 20 % (v/v) i Vit Kit – Freeze NX för en slutlig koncentration på 10 mg/ml HSA och 4 mg/ml dextran.

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

### SAMMANSÄTTNING

#### Salter och joner

Kaliumfosfat  
Natriumklorid  
Kaliumklorid  
Magnesiumsulfat  
Kalciumklorid

#### Aminosyror

L-arginin  
Glycin  
L-histidin  
L-lysin  
L-prolin  
L-tyrosin  
L-alanin  
L-aspartamsyra  
L-asparagin  
L-glutaminsyra  
L-isoleucin  
L-leucin  
L-alanyl-L-glutamin  
L-metionin

L-fenylalanin

L-serin  
L-treonin  
L-tryptofan  
L-valin  
L-cystein

#### Energisubstrat

Dextron  
Natriumpyruvat  
Natriumlaktat

#### Buffert

Natriumbikarbonat  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidanter

Natriumcitrat  
EDTA

#### Antibiotika

Gentamicinsulfat

#### Protein

Humant serumalbumin, HSA

#### Kryoprotektanter

Dextran  
Trehalos  
Etylenglykol  
Dimetylsulfoxid

### KVALITETSSÄKRING

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

Varje lot Vit Kit – Freeze NX utsätts för följande tester:

- Endotoxin, med användning av LAL-metod (Limulus Amebocyte Lysate) ( $\leq 0,6$  EU/ml) enligt USP Bacterial Endotoxins <85> och Ph. Eur. 2.6.14
- Analys av musembryo (en cell) ( $\geq 80$  % expanderad blastocyst)
- Sterilitet enligt aktuellt USP-sterilitetstest <71>, Ph. Eur. 3.2 (godkänd)

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

### MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- Föredragen vitrifieringsenhet
- Sterila petriskålar (50 X 9 mm, Falcon 351006 eller motsvarande)
- Kryrorör (4,5 ml) eller -burkar och hållare för kryrorör
- Hyaluronidas (katalognr 90101) för vitrifiering av oocyter
- Engångshandskar
- Transferpipetter (glaspipetter eller mikropipettspetsar med en inre spetsdiameter på cirka 200  $\mu$ m)
- Pincett eller tång
- Tidtagarur eller timer
- Behållare med flytande kväve (förvaringsbehållare eller cellplastbehållare med lock, volym 1–2 l)
- Flytande kväve (av tillräcklig volym för att åstadkomma ett djup på 4 tum i behållaren)

### BRUKSANVISNING

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l för oocytvitrifieringsprotokoll  
eller  
50  $\mu$ l för embryovitrifieringsprotokoll
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ l för båda vitrifieringsprotokollen
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ l för oocytvitrifieringsprotokoll

## VITRIFIERINGSPROTOKOLL:

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

1. Låt de polymerer av ES, VS och WS som ska användas uppnå rumstemperatur (20–27 °C).

ANM: Undvik att upprepade gånger låta hela ampullerna med ES, VS och WS uppnå rumstemperatur när bara en del av lösningen behövs varje gång. Det är bättre att alkivoterat den volym som ska användas och genast sätta tillbaka ampullerna i kylskåpet vid 2–8 °C efter alkivotering. Washing NX (WS) används för vitrifiering av oocyter.

2. Fyll behållaren för flytande kväve med flytande kväve (flytande N<sub>2</sub>) – tillräckligt för att åstadkomma ett djup på 4 tum eller så att kryoröret på hållaren sänks ned helt – och placera behållaren intill mikroskopet. Sätt fast kryoröret eller -burken (utan lock) på den nedersta klämman på en hållare för kryorör och sänk ned hållaren i det flytande kvävet för att förbereda lagringen av de vitrifierade preparaten.
3. Bestäm hur många preparat som ska vitrifieras.
4. Märk varje steril petriskål (eller lock) och kryoförvaringsenheten med nödvändig information.
5. Undersök vitrifieringsenheten noggrant innan proceduren påbörjas.
6. Vänd varje ampull med ES och VS varsamt för att blanda innehållet före användning.
7. Förbered en skål med droppar av lösning för vitrifieringsproceduren på följande sätt:

### A. Protokoll för vitrifiering av OOCYT (MI):

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

ANM 2: Se avsnitt B för embryovitrifieringsprotokoll.

1. Dispensera aseptiskt en 20 µl-droppe av WS, ES1 och ES2 nära varandra samt ES3, på ett upp-och-nervänt lock från en steril petriskål, så som visas i figur 1, och placera skålen på mikroskopets korsbord:
  - en 20 µl-droppe WS
  - tre 20 µl-droppar (sammanlagt 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3)
2. Ta ut odlingskålen med MI-oocyter från inkubatorn och kontrollera preparatets kvalitet under mikroskop. Välj endast stadie MI-oocyter av bästa kvalitet, när så är möjligt.  
FÖRSIKTIGHET! Minimera exponering av preparatet(-en) för ljus under ekvibrering i WS-, ES- och VS-dropparna.
3. För över oocyten (högst två på en gång) med en minimal volym medium från odlingskålen (i inkubatorn) till 20 µl-droppen WS och låt stå i en minut.
4. För ihop WS-droppen och ES1-droppen (se figur 1, pil 1) med hjälp av transferpipettens spets och låt de två lösningarna blandas spontant i 2 minuter.
5. För sedan ihop ES2-droppen (pil 2) med de redan sammanförda dropparna och låt stå i 2 minuter.
6. För över oocyten(-erna) med en minimal volym lösning från den sammanförda droppen till ES3-droppen och låt stå i 6–10 minuter.  
Anm: Ekvibreringen av oocyten(-erna) i ES3 är fullbordad när zona pellucida och det perivitellina rummet har samma tjocklek. Oocyten(oocyterna) sjunker normalt till botten av droppen inom 3 minuter.
7. Under ekvibreringsperioden i ES3, dispensera aseptiskt en (1) 50 µl-droppe VS före fullständig ekvibrering och förbered den föredragna vitrifieringsenheten för laddning (figur 2).
8. Följande steg (9–13) ska utföras inom 80–110 sekunder.  
FÖRSIKTIGHET! För att förhindra cytotoxicitet ska preparatets exponering för VS begränsas. Preparat(en) tenderar att flyta i VS, så justera mikroskopets fokus så att kontinuerlig visualisering bibehålls under exponeringen och håll transferpipettens spets i närheten så att snabb överflyttning mellan dropparna säkerställs. Se figur 2.
9. Skölj och fyll transferpipettspetsen med VS omedelbart innan ekvibreringen i ES är fullbordad och dra upp preparatet(-en) med minimal volym ES i pipettspetsen och överför det(dem) till VS-droppen i 50–60 sekunder. Leverera oocyterna på botten av VS. När oocyterna levereras flyter de till toppen av VS. För att säkerställa fullständig sköljning i VS, för varsamt oocyterna tillbaka till botten mitt i VS med hjälp av pipettering.  
Oocyterna dehydreras under detta förfarande och flyter tillbaka igen.
10. Ladda och försegla vitrifieringsenheten enligt tillverkarens anvisningar.
11. Placera det(de) vitrifierade preparatet(-en) i den föredragna vitrifieringsenheten i kryoröret eller koppen (på kryorörhållaren) nedsänkt i flytande N<sub>2</sub> – figur 3. Förslut kryoröret (eller koppen) eller sätt fast det upp-och-nedvänt med ett annat kryorör utan lock så att den vitrifierade enheten sitter stadigt i flytande kväve.
12. Flytta behållaren med flytande N<sub>2</sub> intill kryofrysens med flytande N<sub>2</sub> och överför kryorörhållaren med innehåll till kryofrysens för långtidsförvaring.

### B. Vitrifieringsprotokoll för EMBRYON (PN till blastocyst):

1. Dispensera aseptiskt en 50 µl-droppe ES på ett upp-och-nedvänt lock från en petriskål (figur 4).
2. Ta ut odlingskålen med embryot(n) ur inkubatorn och kontrollera preparatets(-ens) kvalitet under mikroskop. Välj endast embryot(n) av bästa kvalitet för vitrifiering, när så är möjligt.
3. För omsorgsfullt över preparatet (högst två i taget) med en minimal volym medium från odlingskålen till ES-droppen och starta tidtagaren.  
Embryona ska ekvibrera långsamt i ES-droppen genom fritt fall under 6–10 minuter.  
ANM 1: Preparatet kommer att krympa och därefter successivt återgå till sin ursprungliga storlek, vilket anger att ekvibreringen är fullbordad.  
FÖRSIKTIGHET! Minimera exponering av preparatet(-en) för ljus under ekvibrering i ES- och VS-dropparna.
4. Under denna ekvibreringsperiod i ES, dispensera aseptiskt en 50 µl-droppe VS-lösning så som visas i figur 4 och förbered den föredragna vitrifieringsenheten för laddning.

5. Skölj och fyll transferpipettspetsen med VS omedelbart innan ekvilibreringsen i ES är fullbordad och dra upp preparatet(-en) med minimal volym ES i pipettspetsen och överför det(dem) till VS-droppen under minst 30 sekunder. Leverera embryona på botten av VS. När embryona levereras flyter de till toppen av VS. För att säkerställa fullständig sköljning i VS, för varsamt embryona tillbaka till botten mitt i VS med hjälp av pipettering.  
ANM 2: Embryona dehydreras under detta förfarande och flyter tillbaka igen.
6. Ladda och försegla vitrifieringsenheten enligt tillverkarens anvisningar.
7. Placera den föredragna vitrifierade vitrifieringsenheten i kryoröret eller koppen (på kryorörhållaren) nedsänkt i flytande N<sub>2</sub>, figur 3. Förslut kryoröret (eller koppen) eller sätt fast det upp-och-nedvänt med ett annat kryorör utan lock så att den vitrifierade enheten sitter stadigt i flytande kväve.
8. Flytta behållaren med flytande N<sub>2</sub> intill kryofrysens med flytande N<sub>2</sub> och överför kryorörhållaren med innehåll till kryofrysens för långtidsförvaring.

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

#### **FÖRVARINGSANVISNINGAR OCH HÅLLBARHET**

Öppnade ampuller ska förvaras i kylskåp vid 2–8 °C. Vid förvaring enligt anvisningarna är Vit Kit – Freeze NX-lösningarna hållbara fram till det utgångsdatum som anges på ampul etiketterna.

Medierna får inte användas under längre tid än fjorton (14) dagar efter att behållarna har öppnats.

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

#### **FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR**

Denna produkt är avsedd att användas av personal med utbildning i procedurer för assisterad befruktning. Dessa procedurer innefattar den avsedda tillämpning som denna produkt är avsedd för.

Den institution där denna produkt används ansvarar för att upprätthålla produktens spårbarhet och måste följa nationella förordningar avseende spårbarhet där så är tillämpligt.

Använd inga ampuller med lösning som uppvisar tecken på skador, läckage, partiklar eller grumling. Kassera produkten enligt gällande bestämmelser.

Använd aseptisk teknik vid hantering, så att kontamination undviks.

Enligt aktuell forskningslitteratur är de långsiktiga effekterna av vitrifiering på oocyter och embryon fortfarande okända.

Flaskor vars sterila förpackning inte är intakt får inte användas.

**EU:** Standardåtgärder för att förhindra infektion orsakad av användning av medicinska produkter framställda av humant blod eller human plasma inkluderar selektion av givare, screening av individuella donerade enheter och plasmapooler för specifika infektionsmarkörer samt införlivande av effektiva tillverkningssteg för inaktivering/avlågsnande av virus. Trots detta kan risken för överföring av infektiösa agens vid administrering av medicinska produkter framställda av humant blod eller human plasma inte helt uteslutas. Detta gäller även okända eller nya virus och andra patogener. Det finns inga rapporter om bevisad virusöverföring via albumin framställt genom etablerade förfaranden enligt den europeiska farmakopéns specifikationer. Det rekommenderas starkt att anteckna produktens namn och batchnummer varje gång odlingsmedier för assisterad befruktning från FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. administreras till en patient, så att produktbatchen ifråga kan förknippas med patienten.

**USA:** Denna produkt innehåller humant serumalbumin (HSA). Humant källmaterial som använts vid framställningen av denna produkt har testats med satsar licensierade av FDA (Food and Drug Administration i USA), och befunnits vara icke-reaktiva för antikroppar mot hepatit C (HCV) samt antikroppar mot humant immunbristvirus (HIV). Det finns dock ingen testmetod som fullständigt kan garantera att produkter framställda av humant källmaterial inte är infektiösa. Hantera allt material av humant ursprung som om det vore smittförande, med användning av universella försiktighetsåtgärder. Givarna av källmaterialet har också screenats för Creutzfeldt-Jakobs sjukdom.

#### **KONTRAINDIKATIONER**

Produkten innehåller gentamicinsulfat. Adekvata försiktighetsåtgärder ska vidtas för att säkerställa att patienten inte är allergisk mot detta antibiotikum.



**ELI HOIATUS:** ainult professionaalseks kasutamiseks.

### SIHTOTSTARVE

Vit Kit - Freeze NX on mõeldud kasutamiseks abistatud viljastamisprotseduurides inimese ootsüütide (MI), pronukleaarsete (PN) sügootide ning 3. päeva jagunemisfaasis embrüote ja blastotsüsti faasis embrüote vitrifitseerimiseks ja säilitamiseks.

### SEADME KIRJELDUS

**Equilibration NX-ES** on söötmel Continuous Single Culture (CSCM) kahekordselt puhverdatud lahus (HEPES & MOPS), mis sisaldab gentamütsiinsulfaati, 7,5% (mahuprotsenti) nii DMSO-d kui ka etüleenglükooli ning 20% (mahuprotsenti) Dextran Serum Supplementi (DSS).

**Vitrification NX-VS** on CSCM-i kahekordselt puhverdatud lahus (HEPES & MOPS), mis sisaldab gentamütsiinsulfaati, 15% (mahuprotsenti) nii DMSO-d kui ka etüleenglükooli ning 20% (mahuprotsenti) DSS-i ja 0,5 M trehaloosi.

**Washing NX-WS** on CSCM-i kahekordselt puhverdatud lahus (HEPES & MOPS), mis sisaldab gentamütsiinsulfaati ja 20% DSS-i.

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

Neid lahuseid tuleb kasutada järjest, sammamulise mikrotiik-vitrifitseerimisprotokoll kohaselt.

### KOOSTIS

#### Soolad ja ioonid

Kaaliumfosfaat  
Naatriumkloriid  
Kaaliumkloriid  
Magneesiumsulfaat  
Kaltsiumkloriid

#### Aminohapped

L-arginiin  
Glutsiin  
L-histidiin  
L-lüsiin  
L-proliin  
L-türosiin  
L-alaniin  
L-aspartaat  
L-asparagiin  
L-glutamühape  
L-isoleutsiin  
L-leutsiin  
L-alanüül-L-glutamiin  
L-metioniin

L-fenüülalaniini  
L-seriin  
L-treoniin  
L-trüptofaan  
L-valiin  
L-tsüsteiin

#### Energia substraadid

Dekstroos  
Naatriumpüruvaat  
Naatriumlaktaat

#### Puhver

Naatriumvesinikkarbonaat  
HEPES  
MOPS

#### Antioksiidid

Naatriumtsitraat  
EDTA

#### Valk

Inimese seerumi albumiin,  
HSA

#### Krüokaitseained

Dekstraan  
Trehaloos  
Etüleenglükool  
Dimetüülsulfoksiid

### KVALITEEDI TAGAMINE

Vit Kit - Freeze NX-i lahused on membraanfiltritud ning aseptiliselt töödeldud valdeeritud töötlemisprotsesside kohaselt.

Iga Vit Kit - Freeze NX-i partii läbib järgmised testid.

- Endotoksiini määramine limuluse amöbotsüüdi lüsaadi (LAL) meetodil ( $\leq 0,6$  EÜ/ml), USP bakteriaalsete endotoksiinide  $<85>$  ja Ph. Eur. 2.6.14 järgi.
- Hiire embrüo analüüs (üherakuline,  $\geq 80\%$  suurendatud blastotsüst)
- Steriilsus kehtiva USP steriilsustestiga  $<71>$ , Ph. Eur. 3.2 järgi (läbitud)

Kõik tulemused on avaldatud konkreetset partii puudutavas analüüsifertiifikaadis, mida võite soovi korral taotleda.

### VAJALIKUD, KUID KOMPLEKTI MITTEKUULUVAD MATERJALID

- Vitrifitseerimisvahend omal vaikul
- Steriilsed Petri tassid (50 x 9 mm, Falcon 351006 või samaväärsed)
- Krüokatsutid (4,5 ml) või keeduklaasid ja krüopulgad
- Hüaluronidaas (kataloogi nr 90101) ootsüütide vitrifitseerimiseks
- Ühekorrakindad
- Ülekandepipetid (klaaspipetid või mikropipettotsakud, mille otsaku siseläbimõõt on u 200 µm)
- Pintsetid või tangid
- Stopper või taimer
- Vedela lämmastiku nõu (Dewar või kaanega vahtplastist nõu, 1–2 l)
- Vedel lämmastik (pisavalt, et nõus oleks seda 4 tolli)

### KASUTUSJUHEND

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60 µl ootsüütide vitrifitseerimise protokoll jaoks  
või  
50 µl embrüo vitrifitseerimise protokoll jaoks

- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl mõlema vitrifitseerimise protokolliga jaoks
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl ootsüütide vitrifitseerimise protokolliga jaoks

## VITRIFITSEERIMISE PROTOKOLL:

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

1. Laske kasutataval ES-i, VS-i ja WS-i kogustel jõuda toatemperatuurile (20–27 °C).

MARKUS. Kui vajate iga kord vaid osa lahust, siis ärge tooge terveid ES-i, VS-i ja WS-i viaale korduvalt toatemperatuurile. Parem on kasutatav kogus alikvooldada ja viaalid seejärel tagasi 2–8 °C temperatuurile viia. Washing NX-i (WS) kasutatakse ootsüütide vitrifitseerimiseks.

2. Täitke vedela lämmastiku nõu vedela lämmastikuga (LN<sub>2</sub>) – piisavalt, et seda oleks 4 tolli sügavusel või niipalju, et krüokatsuti või -pulk oleks täielikult kaetud – ning asetage mikroskoobi lähedusse. Kinnitage krüokatsuti või keeduklaasa (ilma korgita) krüopulga alumisse hoidikusse ning tõstke vedelasse lämmastikku, et valmistada see vitrifitseeritud proovide hoidmiseks ette.
3. Määrake vitrifitseeritavate proovide arv.
4. Sildistage iga steriilne Petri tass (või kaas) ja krüosäilitusvahend vajaliku teabega.
5. Vaadake vitrifitseerimisvahend enne protseduuri alustamist hoolikalt üle.
6. Keerake iga ES-i ja VS-i viaali õrnalt ümber, et sisu enne kasutamist segada.
7. Valmistage tass lahuseilkadega vitrifitseerimisprotseduuriks järgmiselt ette:

### A. OOTSÜÜTIDE (MII) vitrifitseerimise protseduur

MARKUS 1. Kogutud ootsüüdid puhastatakse hüaluronidaasiga veendumaks, et tegu on MII-ga.

MARKUS 2. Embrüo vitrifitseerimise protokoll viit lõigust B.

1. Kandke aseptilist tehnikat kasutades 20 µl tilgad WS-is, ES1 ja ES2 lähestikku ning ES3 steriilse Petri tassi tagurpidi kaanele, nagu näidatud joonisel 1, ja asetage tass mikroskoobialusele:
  - üks 20 µl WS-i tilk
  - kolm 20 µl tilka (kokku 60 µl) ES-i (ES1, ES2, ES3)
2. Eemaldage söötmetass MII ootsüütidega inkubaatorist ja kontrollige proovide kvaliteeti mikroskoobi all. Kui on võimalik, valige üksnes parima kvaliteediga MII faasi ootsüüdid.  
ETTEVAATUST! WS-i, ES-i ja VS-i tilkades tasakaalustamise ajal vähendage proovi(de) kokkupuudet valgusega.
3. Viige ootsüüt (kuni 2 tk korraga) koos minimaalse söötmemahuga tassist (inkubaatoris) üheks minutiks 20 µl WS-i tilga sisse.
4. Ühendage WS-i tilk ülekandepipeti otsaku abil ES1-ga (vt joonist 1, nool 1) ja laske kahel lahusel 2 minuti jooksul spontaanselt seguneda.
5. Seejärel ühendage ES2 tilk (nool 2) varem ühendatud tilkadega ja laske 2 minutit seista.
6. Viige ootsüüt (ootsüüdid) koos minimaalse koguse lahusega segatud tilgast 6–10 minutiks ES3 tilga sisse.

MARKUS. Ootsüüdi (ootsüütide) tasakaalustamine ES3 sees on lõppenud, kui läbipaistva võlme ja perivelliline ruumi paksus on võrdne. Ootsüüt (ootsüüdid) settib(vad) harilikult 3 minutiga tilga põhja.

7. ES3-s toimuva tasakaalustamise ajal jaotage aseptilist tehnikat kasutades üks (1) 50 µl VS-i tilk, et tasakaalustamine lõpetada, ja valmistage laadimiseks ette eelstatud vitrifitseerimisvahend (joonist 2).
8. Järgmised sammud (9–13) tuleb teha 80–110 sekundi jooksul.

ETTEVAATUST! Proovide kokkupuudet VS-iga tuleb tsütotoksilisuse ärahoidmiseks piirata. Proov(id) kipuvad VS-is hõljuma, seepärast reguleerige mikroskoobi fookust, et säilitada kokkupuute ajal pidevat nähtavust, ning hoidke ülekandepipeti otsak käepärast, et tagada kiire tilkadevaheline üleviimine. Vt joonist 2.

9. Loputage ülekandepipeti otsakut ning täitke see VS-iga vahetult enne ES-i tasakaalustamise lõppu, tõmmake proov(id) koos minimaalse ES-iga pipeti otsakusse ja viige 50–60 sekundiks üle VS-i tilga sisse. Kandke ootsüüdid VS-i põhja. Ülekandmise käigus tõusevad ootsüüdid VS-i pinnale. Täielikuks VS-iga loputamiseks lükake ootsüüdid pipetiga õrnalt tagasi alla keskele. Selle protseduuri käigus ootsüüdid dehüdreeruvad ja tõusevad taas üles.
10. Laadige ja sulgege vitrifitseerimisvahend tootja juhiste kohaselt.
11. Asetage vitrifitseeritud proov(id) valitud vitrifitseerimisvahendiga LN<sub>2</sub> sisse asetatud krüokatsutisse või keeduklaasi (krüopulga otsas). Vt joonist 3. Korgige krüokatsuti (või keeduklaasa) või kinnitage see tagurpidi teise korkimata krüokatsutiga, et vitrifitseerimisvahend vedelas lämmastikus paigal püsiks.
12. Tõstke LN<sub>2</sub> nõu LN<sub>2</sub> krüokülmuti lähedale ja viige krüopulk koos sisuga pikaajaliseks säilitamiseks üle krüokülmutisse.

### B. EMBRÜOTE (PN – blastotsüst) vitrifitseerimise protokoll

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



5. Loputage ülekandepipeti otsakut ning täitke see VS-iga vahetult enne ES-i tasakaalustamise lõppu, tõmmake proov(id) koos minimaalse ES-iga pipeti otsakusse ja viige vähemalt 30 sekundiks üle VS-i tilga sisse. Kandke embrüüd VS-i põhja. Ülekandmise käigus tõusevad embrüüd VS-i pinnale. Täielikuks VS-iga loputamiseks lükake embrüüd pipetiga õrnalt tagasi alla VS-i keskele. MÄRKUS 2. Selle protseduuri käigus embrüüd dehüdreeruvad ja tõusevad taas üles.
6. Laadige ja sulgege vitrifitseerimisvahend tootja juhiste kohaselt.
7. Asetage valitud vitrifitseerimisvahend LN<sub>2</sub> sisse asetatud krüokatsutisse või keeduklaasi (krüopulga otsas). Vt joonis 3. Korkige krüokatsuti (või keeduklaas) või kinnitage see tagurpidi teise korkimata krüokatsutiga, et vitrifitseerimisvahend vedelas lämmastikus paigal püsiks.
8. Tõstke LN<sub>2</sub> nõu LN<sub>2</sub> krüokülmuti lähedale ja viige krüopulk koos sisuga pikaajaliseks säilitamiseks üle krüokülmutisse.

Lisateabe saamiseks nende toodete kasutamise kohta peavad laborid tutvuma oma protseduuride ja protokollidega, mis on välja töötatud ja optimeeritud spetsiaalselt nende individuaalse meditsiiniprogrammi jaoks.

### SÄILITUSJUHISED JA STABIILSUS

Hoidke avamata viaale külmkapis temperatuuril 2–8 °C. Juhistekohasel säilitamisel on Vit Kit - Freeze NX-i lahused stabiilsed kuni viaali etiketidel näidatud aegumiskuupäevani.

Ärgе kasutage söödēt üle neljateistkümne (14) päeva pärast anumate avamist.

Kuna tootes sisaldub inimpärilolu materjali, võivad selles tekkida säilitamisel osakesed. Need osakesed ei põhjusta teadaolevalt toote jõudluse muutusi.

### ETTEVAATUSABINÕUD JA HOIATUSED

See seade on mõeldud kasutamiseks personalile, kes on saanud väljaõppe abistatud viljastamisprotseduuride alal. Need protseduurid hõlmavad seadme sihtotstarbelist kasutamist.

Vahendit kasutav asutus vastutab toote jälgitavuse eest ja peab vajaduse korral järgima jälgitavust puudutavaid riiklikke eeskirju.

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

Saastumise vältimiseks käsitsige vahendeid aseptilist tehnikat kasutades.

Praegusel ajal näitab erialane kirjandus, et vitrifitseerimise pikaajalised mõjud ootsüütidele ja embrüotele on teadmata.

Ärgе kasutage ühtegi pudelit, mille steriilne pakend on kahjustunud.

EL: inimestest või -plasmast valmistatud ravimite manustamisega kaasneva infektsiooniohu vältimiseks kasutatakse standardmeetmetena mh doonorite valimist, individuaalse doonorvere ja kokkusegatud plasma skriinimist spetsiifiliste infektsioonimarkerite suhtes ning selliste tootmisprotsesside rakendamist, mis inaktiveeriks või hävitaksid tõhusalt viiruseid. Hoolimata sellest ei saa inimestest või -plasmast valmistatud ravimite manustamisel täielikult välistada infektsioonikandjate ülekandumist. See kehtib ka senitudmatute või uute viiruste ja teiste patogeenide kohta. Puuduvad tõendid viiruse ülekandumise kohta Euroopa Farmakopöa spetsifikatsioonidele vastava tootmisprotsessiga saadud albumiini vahendusel. Selleks et hoida seost patsiendi ja tootepartii vahel, on tungivalt soovitatav, et iga kord, kui patsiendile manustatakse ettevõttes FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. toodetud reproduktiivset söödēt, märgitakse üles toote nimetus ja partii number.

USA: toode sisaldab inimese seerumi albumiini (HSA). Selle preparaadi tootmisel kasutatud inimpäriloluga lähtematerjali on testitud USA Toidu- ja Ravimiameti (FDA) litsentsitud katsekomplektidega ning on leitud, et need on C-hepatidi (HCV) antikehade ja inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) antikehade suhtes mittereaktiivsed. Siiski ei taga ükski testimismeetod täielikult, et inimpäriloluga tooted on infektsioonivabad. Käideldge kõiki inimpäriloluga lähtematerjale nakkust edastada võiva materjalina ja rakendage üldisi ettevaatusabinõusid. Algmaterjali doonoreid on skriinitud ka CJD suhtes.

### VASTUNÄIDUSTUS

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



## MAGYAR

**EU-FIGYELMEZTETÉS:** Kizárólag professzionális felhasználásra.

### FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Vit Kit-Freeze NX asszisztált reprodukciós eljárásokban való alkalmazására szolgál, humán petesejtek (MI), pronukleáris (PN) zigótától 3 napos, barázdálódási szakaszban lévő embriók és blasztociszta stádiumban lévő embriók vitrifikációjához és tárolásához.

### TERMÉKISMERTETÉS

Az **Equilibration NX-ES** a Continuous Single Culture Medium (CSCM) kétszeresen pufferelt oldata (HEPES és MOPS), amely gentamicin-szulfátot, 7,5% (v/v) DMSO-t és etilén-glikolt, valamint 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS) készítményt tartalmaz.

A **Vitrification NX-VS** a CSCM kétszeresen pufferelt oldata (HEPES és MOPS), amely gentamicin-szulfátot, 15% (v/v) DMSO-t és etilén-glikolt, 20% (v/v) DSS-t és 0,5 M trehalózt tartalmaz.

A **Washing NX-WS** a CSCM kétszeresen pufferelt oldata (HEPES és MOPS), amely gentamicin-szulfátot és 20% DSS-t tartalmaz.

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

Ezeket az oldatokat egymás után kell alkalmazni a lépésenkénti mikrocepp-vitrifikációs protokollnak megfelelően.

### ÖSSZETÉTEL

#### Sók és ionok

Kálium-foszfát  
Nátrium-klorid  
Kálium-klorid  
Magnézium-szulfát  
Kalcium-klorid

#### Aminosavak

L-arginin  
Glicin  
L-hisztidin  
L-lizin  
L-prolin  
L-tirozin  
L-alanin  
L-aszparaginsav  
L-aszparagin  
L-glutaminsav  
L-izoleucin  
L-leucin  
L-alanil-L-glutamin  
L-metionin

L-fenilalanin

L-szerin  
L-treonin  
L-triptofán  
L-valin  
L-cisztin

#### Energiaszubsztrátok

Dextróz  
Nátrium-piruvát  
Nátrium-laktát

#### Puffer

Nátrium-bikarbonát  
HEPES  
MOPS

#### Antioxidánsok

Nátrium-citrát  
EDTA

#### Fehérje

Humán szérumalbumin (HSA)

#### Krioprotektánsok

Dextrán  
Trehalóz  
Etilén-glikol  
Dimetil-szulfoxid

#### Antibiotikum

Gentamicin-szulfát

### MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

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

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

- Endotoxin limulus amóbobita lizátum (LAL) módszerrel ( $\leq 0,6$  EU/ml) az Amerikai Gyógyszerkönyv <85> bakteriális endotoxinokra vonatkozó és az Európai Gyógyszerkönyv 2.6.14 vizsgálatával;
- Egérembrío-assay (egysejtes) ( $\geq 80\%$  kiterjesztett blasztociszta);
- Sterilitás a jelenlegi Amerikai Gyógyszerkönyv <71> sterilítási és az Európai Gyógyszerkönyv 3.2 (Sikeres) vizsgálatával.

Minden eredményről jelentés készül egy tétel-specifikus analitikai bizonylaton, amely kérésre hozzáférhető.

### SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ANYAGOK

- Választott vitrifikációs eszköz
- Steril Petri-csészék (50 × 9 mm-es, Falcon 351006 vagy azzal egyenértékű)
- Kriocsövek (4,5 ml-es) vagy kelyhek és cryocane-ek
- Hialuronidáz (katalógusszám: 90101) a petesejtek vitrifikációjához
- Eldobható kesztyűk
- Transzferpipetták (húzott üveg pipetták vagy mikropipettahegyek, ~200 µm-es belső hegyátmérővel)
- Csipesz vagy fogó
- Stopperóra vagy időzítő
- Folyékony nitrogénes tartály (dewar vagy polisztirolhab-tartály fedéllel, 1-2 l-es térfogat)
- Folyékony nitrogén (elegendő mennyiség a tartályban a 4 hüvelykes mélység eléréséhez)

### HASZNÁLATI UTASÍTÁS

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60 µl a petesejt-vitrifikációs protokollhoz  
vagy  
50 µl az embrió-vitrifikációs protokollhoz
- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl mindkét vitrifikációs protokollhoz
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl a petesejt-vitrifikációs protokollhoz

## VITRIFIKÁCIÓS PROTOKOLL:

MEGJEGYZÉS: Az eljárásokat szobahőmérsékleten (20–27 °C) kell elvégezni. NE HASZNÁLJON melegített mikroszkóptárgyasztalt a következő eljárásokhoz.

VIGYÁZAT! Az ES- és VS-olatokban történő kiegyenlítés során minimalizálja a minta fénynek való kitétséget.

1. Az ES, a VS és a WS felhasználandó mennyiségének hőmérsékletét állítsa szoba-hőmérsékletűre (20–27 °C).  
MEGJEGYZÉS: Ne melegítse fel ismétellen szoba-hőmérsékletűre a teljes ES-, VS- és WS-fiólákat, ha minden alkalommal csak egy része szükséges az oldatnak. Javasoljuk, hogy mérje ki a felhasználandó mennyiséget, és a kimérés után azonnal tegye vissza a fiólkát 2–8 °C-ra. A Washing NX (WS) a petesejt-vitrifikációhoz használandó.
2. Töltse fel a folyékony nitrogénes tartályt annyi folyékony nitrogénnel (LN<sub>2</sub>), amely elegendő a 4. hűtelykes mélység eléréséhez vagy a cryocane-en található kriocső teljes alamerítéséhez, és helyezze a mikroszkóp közelébe. Csatlakoztasson egy kriocsővet vagy (le nem zárt) kelyhet egy cryocane alsó fogójához, és mérítse folyékony nitrogénbe a vitrifikált minták tárolásának előkészítéséhez.
3. Határozza meg a vitrifikálandó minták számát.
4. Címkezza fel az összes steril Petri-csészét (vagy fedelet) és krio tárolóeszközt a szükséges információkkal.
5. Az eljárás megkezdése előtt gondosan vizsgálja meg a vitrifikációs eszközt.
6. Óvatosan fordítsa le-fel az egyes ES- és VS-fiólákat a tartalmuk használat előtti összekeveréséhez.
7. Készítse elő az oldatcseppeket tartalmazó csészéket a vitrifikációs eljáráshoz az alábbiak szerint:

### A. PETESEJT (MII) vitrifikációs protokollja:

1. MEGJEGYZÉS: A kinyert petesejteket hialuronidázzal csupasztíjuk le MII állapotuk megerősítése érdekében.
2. MEGJEGYZÉS: Az embrívitrifikációs protokollt lásd a B szakaszban.
  1. Aszeptikusan adagoljon egy 20 µl-es WS-, ES1- és ES2-csippet egymás közelébe és egy ES3-csippet a steril Petri-csészé megfordított fedelére az 1. ábrán látható módon, majd helyezze a csészét a mikroszkóp tárgyasztalára:
    - egy 20 µl-es WS-csipp
    - három 20 µl-es ES-csipp (ES1, ES2, ES3) (összesen 60 µl)
  2. Vegye ki az MII petesejteket tartalmazó tenyésztőcsészét az inkubátorból, és mikroszkóp alatt ellenőrizze a minták minőségét. Ha lehetséges, csak a legjobb minőségű MII stádiumú petesejte(ke)t válassza ki.
- VIGYÁZAT! A WS-, ES- és VS-cseppekben történő kiegyenlítés során minimalizálja a minta (minták) fénynek való kitétséget.
3. Helyezze át a petesejtet (egyszerre legfeljebb kettőt) minimális mennyiségű médiummal az (inkubátorban lévő) tenyésztőcsészéből a 20 µl-es WS-csippbe egy percre.
4. Egyesítse a WS-csippet az ES1-csippel (lásd az 1. ábrán az 1. nyilat) a transzferpipetta hegyével, és hagyja 2 percig spontán keveredni a két oldatot.
5. Ezután egyesítse az ES2-csippet (2. nyíl) a korábban egyesített cseppekkel, és hagyja 2 percig.
6. Helyezze át a petesejte(ke)t minimális mennyiségű oldattal az egyesített cséppből az ES3-csippbe 6–10 percre.  
Megjegyzés: A petesejt(ek) ES3-ban történő kiegyenlítése akkor fejeződik be, amikor a zona pellucida és a perivitellináris tér vastagsága megegyezik. A petesejt (petesejtek) általában 3 percen belül a csepp alján helyezkedik (helyezkednek) el.
7. Az ES3-ban történő kiegyenlítés ideje alatt aszeptikusan adagoljon egy (1) 50 µl-es VS-csippet a teljes kiegyenlítés előtt, és készítse elő a választott vitrifikációs eszközt a behelyezéshez (2. ábra).
8. A következő lépéseket (9–13. lépés) 80–110 másodperc alatt kell elvégezni.  
VIGYÁZAT! A minták VS-expozícióját korlátozni kell a citotoxicitás megakadályozása érdekében. A minták általában a VS tetején úsznak, ezért úgy állítsa be a fókust a mikroszkópon, hogy az expozíció során a vizualizáció folyamatos legyen, és tartsa a transzferpipetta hegyét a közelben a cseppek közötti gyors átvitel biztosítása érdekében. Lásd a 2. ábrát.
9. A transzferpipetta hegyét közvetlenül az ES-ben történő kiegyenlítés befejezése előtt öblítse át és töltse fel VS-szel, szívja fel a mintá(ka)t minimális mennyiségű ES-szel a pipetta hegyébe, és helyezze át a VS-csippbe 50–60 másodpercre. Helyezze a petesejteket a VS alá. Az elhelyezés közben a petesejtek fel fognak úszni a VS tetejére. A VS-szel való teljes átöblítés érdekében pipettázással óvatosan mozgassa vissza a petesejteket a VS alsó középső részére.  
Ezen folyamat során a petesejtek kiszáradnak és újra fel fognak úszni.
10. Helyezze be és zárja le a vitrifikációs eszközt a gyártó utasításai szerint.
11. Helyezze a vitrifikált mintá(ka)t a választott vitrifikációs eszközön az alamerített, LN<sub>2</sub>-vel teli kriocsőbe vagy kehelybe (a cryocane-en) – 3. ábra. Zárja le a kriocsővet (vagy kelyhet) vagy csatlakoztassa fejfelé egy másik, lezáratlan kriocsőhöz a vitrifikált eszköz folyékony nitrogénben történő rögzítéséhez.
12. Helyezze az LN<sub>2</sub>-tartályt az LN<sub>2</sub>-kriofagyasztó közelébe, és helyezze a cryocane-t a tartalmával együtt a kriofagyasztóba a hosszú távú tároláshoz.

### B. EMBRIÓ (PN-től blastocisztáig) vitrifikációs protokollja

1. Aszeptikusan adagoljon egy 50 µl-es ES-csippet egy Petri-csészé felfordított fedelére (4. ábra).
2. Vegye ki az embrió(ka)t tartalmazó tenyésztőcsészét az inkubátorból, és mikroszkóp alatt ellenőrizze a minta (minták) minőségét. Ha lehetséges, csak a legjobb minőségű embrió(ka)t válassza ki a vitrifikációhoz.
3. Óvatosan helyezze át a mintát (egyszerre legfeljebb kettőt) minimális mennyiségű médiummal a tenyésztőcsészéből az ES-csippbe, és indítsa el az időzítőt.  
Az embrióknak az ES-csippben lassan, szabadeséssel, 6–10 perc alatt kell egyensúlyba kerülniük.
  1. MEGJEGYZÉS: A minta zsugorodni fog, majd fokozatosan visszanyeri az eredeti méretét, ami azt jelzi, hogy a kiegyenlítés befejeződött.
- VIGYÁZAT! Az ES- és VS-cseppekben történő kiegyenlítés során minimalizálja a minta (minták) fénynek való kitétséget.
4. Az ES-ben történő kiegyenlítés ideje alatt aszeptikusan adagoljon egy 50 µl-es VS-csippet a 4. ábrán látható módon, és készítse elő a választott vitrifikációs eszközt a behelyezéshez.

5. A transzferpipetta hegyét közvetlenül az ES-ben történő kiegyenlítés befejezése előtt öblítse át és tölts fel VS-szel, szívja fel a mintá(ka)t minimális mennyiségű ES-szel a pipetta hegyébe, és helyezze át a VS-cseppbe legalább 30 másodpercre. Helyezze az embriókat a VS aljára. Az elhelyezés közben az embriók fel fognak úszni a VS tetejére. A VS-szel való teljes öblítés érdekében pipettázással óvatosan mozgassa vissza az embriókat a VS alsó középső részére.
2. MEGJEGYZÉS: Ezen folyamat során az embriók kiszáradnak és újra fel fognak úszni.
6. Helyezze be és zárja le a vitrifikációs eszközt a gyártó utasításai szerint.
7. Helyezze a választott, vitrifikált vitrifikációs eszközt az alámerített, LN<sub>2</sub>-vel teletöltött kriocsőbe vagy kehelybe (a cryocane-en) – 3. ábra. Zárja le a kriocsövet (vagy kelyhet) vagy csatlakoztassa fejfel lefelé egy másik, lezárt kriocsőhöz a vitrifikált eszköz folyékony nitrogénben történő rögzítéséhez.
8. Helyezze az LN<sub>2</sub>-tartályt az LN<sub>2</sub>-kriofagyasztó közelébe, és helyezze a cryocane-t a tartalmával együtt a kriofagyasztóba a hosszú távú tároláshoz.

A termékek használatára vonatkozó további részletekért minden laboratóriumnak a saját laboratóriumi eljárásait és protokolljait kell figyelembe vennie, amelyeket specifikusan a saját orvosi programjukhoz hoztak létre és optimalizáltak.

#### **TÁROLÁSI UTASÍTÁSOK ÉS STABILITÁS**

A bontatlan fiolákat tárolja hűtve, 2 °C és 8 °C között. A Vit Kit-Freeze NX oldatok stabilak a fiolák címkéjén feltüntetett lejárati időig, ha tárolásuk az utasításoknak megfelelően történik.

A tartályok kinyitása után ne használja a médiumokat tizennégy (14) napnál tovább.

Mivel a termékben humán eredetű anyag található, ezért a tárolás során részecskék alakulhatnak ki. Nem ismert, hogy ezek a részecskék befolyásolnák a termék teljesítményét.

#### **ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK**

Ezt a terméket az asszisztált reprodukciós eljárásokban képzett személyzet általi felhasználásra szánták. Ezen eljárások közé tartozik az az alkalmazás is, amelyre ezt a terméket szánták.

A terméket használó intézmény felelős a termék nyomon követhetőségének fenntartásáért, és be kell tartania a nyomon követhetőségre vonatkozó országos előírásokat, ha vannak ilyenek.

Ne használja az oldat olyan fioláját, amely sérült, szivárog, részecskék jelenlétét, illetve zavarosságot mutat. A terméket a vonatkozó előírásoknak megfelelően dobja ki.

A beszennyeződéssel járó problémák elkerülése érdekében aszeptikus technikák alkalmazásával kezelje.

Jelenleg a kutatási szakirodalom szerint a vitrifikációnak a petesejtekre és az embriókra gyakorolt hosszú távú hatása ismeretlen.

Ne használjon olyan üveget, amelynek a steril csomagolása megsérült.

EU: A humán vérből vagy plazmából készült gyógyszerkészítmények használatából eredő fertőzések megakadályozására irányuló szokásos intézkedések közé tartozik a donorok kiválasztása, az egyes véradományok és plazmapoolok szűrése a fertőzések specifikus markereire, valamint a vírusok hatástalanítása/eltávolítása érdekében elvégzett hatékony gyártási lépések. Ennek ellenére a humán vérből vagy plazmából készült gyógyszerkészítmények beadásakor nem zárható ki teljesen a fertőző ágensek átadásának lehetősége. Ez érvényes az ismeretlen és újonnan megjelenő vírusokra és más kórokozókra is. Az Európai Gyógyszerkönyv leírása szerinti eljárásokkal gyártott albumin esetében nem jelentettek bizonyított vírusfertőzést. Ha FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. Reproductive Media Products tenyésztőmédiumot adnak be egy betegnek, erősen javallott a termék nevét és tételszámát feljegyezni, hogy ismert maradjon a termék tételének és a betegnek a kapcsolata.

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK: Ez a termék humán szérumalbumint (HSA) tartalmaz. A termék előállítása során használt emberi eredetű anyag az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhivatala által hitelesített készülékekkel vizsgálva nem adott reakciót a hepatitis C (HCV) és a humán immundeficiencia vírus (HIV) elleni antitestekkel. Azonban egyetlen vizsgálati módszer sem garantálja azt teljes bizonyossággal, hogy az emberi eredetű készítmények nem fertőzőek. Minden emberi eredetű anyagot úgy kell kezelni, mintha fertőzőképes lenne, ezért meg kell tenni az általános övintézkedéseket. A donorokat Creutzfeldt–Jakob-kór (CJD) is szűrték.

#### **ELLENJAVALLAT**

A termék gentamicin-szulfátot tartalmaz. Megfelelő elővigyázatossági intézkedéseket kell tenni, hogy megbizonyosodjon, a beteg nem szenzitizált erre az antibiotikumra.



## LIETUVIŲ K.

**ES PERSPĖJIMAS.** Skirta naudoti tik specialistams.

### NUMATYTOJI PASKIRTIS

„Vit Kit - Freeze NX“ yra skirtas naudoti atliekant pagalbinio apvaisinimo procedūras, skirtas žmogaus kiaušialąsčių (MI), zigotų su prandrduoliais (PN) 3 dienos skilimo stadijos embrionų ir blastocistos stadijos embrionų vitrifikacijai ir laikymui.

### ITAISO APRĄŠYMAS

„Equilibration NX-ES“ yra dvejopai buferintas (HEPES ir MOPS) „Continuous Single Culture“ terpės (CSCM) tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato, po 7,5 % (v/v) dimetilsulfoksido (DMSO) ir etilenglikolio bei 20 % (v/v) dekstrano serumo priedo (DSS).

„Vitrification NX-VS“ yra dvejopai buferintas (HEPES ir MOPS) CSCM terpės tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato, po 15 % (v/v) dimetilsulfoksido (DMSO) ir etilenglikolio bei 20 % (v/v) DSS ir 0,5 M trehalozės.

„Washing NX-WS“ yra dvejopai buferintas (HEPES ir MOPS) CSCM tirpalas, kurio sudėtyje yra gentamicino sulfato ir 20 % DSS.

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

Šie tirpalai bus naudojami sekoje pagal nuoseklų mikrolašų vitrifikacijos protokola.

### SUDĖTIS

#### Druskos ir jonai

Kalio fosfatas  
Natrio chloridas  
Kalio chloridas  
Magnio sulfatas  
Kalčio chloridas

#### Aminorūgštys

L-argininas  
Glicinas  
L-histidinas  
L-lizinas  
L-prolinas  
L-tirozinas  
L-alaninas  
L-asparto rūgštis  
L-asparaginas  
L-glutamino rūgštis  
L-izoleucinas  
L-leucinas  
L-alanilo L-glutaminas  
L-metioninas

L-fenilalaninas  
L-serinas  
L-treoninas  
L-triptofanas  
L-valinas  
L-cistinas

#### Antioksidantai

Natrio citratas  
EDTA

#### Antibiotikai

Gentamicino sulfatas

#### Energetiniai substratai

Dekstrozė  
Natrio piruvatas  
Natrio laktatas

#### Baltymas

Žmogaus serumo albuminas,  
ŽSA

#### Krioprotekcinės medžiagos

Dekstranas  
Trehalozė  
Etilenglikolis  
Dimetilsulfoksidas

#### Buferinis tirpalas

Natrio bikarbonatas  
HEPES  
MOPS

### KOKYBĖS UŽTIKRINIMAS

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

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

- endotoksinių kiekio nustatymas pagal kardauodegio krabo amebocitų lizato (LAL) analizės metodą ( $\leq 0,6$  EU/ml) naudojant Jungtinių Amerikos Valstijų farmakopėjos bakterinius endotoksinius  $<85>$  ir Eur. Farm. 2.6.14;
- pelės embriono tyrimas (vienos ląstelės) ( $\geq 80$  % padidėjusi blastocista);
- sterilumo pagal šiuo metu patvirtintą Jungtinių Valstijų farmakopėjos sterilumo testą  $<71>$ , Eur. Farm. 3.2 (atitinka reikalavimus).

Visi rezultatai pateikiami pagal atskirų partijų parametrus parengtuose analizės sertifikatuose, kuriuos galima gauti užsakius.

### REIKALINGOS, BET NEPAATEIKIAMOS PRIEMONĖS

- Pasirinktas vitrifikacijos prietaisas
- Sterilios petri lėkštelės (50 X 9 mm, „Falcon 351006“ arba analogiškos)
- Kriogeniniai mėgintuvėliai (4,5 ml) arba taurės ir kriogeniniai laikikliai
- Hialuronidazė (katalogo nr. 90101) oocitų vitrifikacijai
- Vienkartinės pirštinės
- Perkėlimo pipetės (stiklo pipetės arba mikropipetės antgaliai, kurių vidinis skersmuo  $\sim 200$   $\mu$ m)
- Pincetas ar žnyplės
- Chronometras arba laikmatis
- Skystojo azoto indas (diuaro arba polistirolo talpyklė su dangteliu, 1–2 l tūris)
- Skystasis azotas (pakankamas tūris 4 colių gyliui pasiekti talpyklėje)

### NAUDOJIMO NURODYMAI

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

- „Equilibration NX-ES“ (ES):  
60  $\mu$ l oocitų vitrifikacijos protokolui  
arba  
50  $\mu$ l embriono vitrifikacijos protokolui

- „Vitrification NX-VS“ (VS):  
50 µl bet kuriam vitrifikacijos protokolui
- „Washing NX-WS“ (WS):  
20 µl oocitų vitrifikacijos protokolui

## VITRIFIKACIJOS PROTOKOLAS

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

1. Naudojamą ES, VS ir WS kiekį sušildykite iki kambario temperatūros (20–27 °C).  
PASTABA. Stenkitės pakartotinai nesusūdyti visų ES, VS ir WS flakonų iki kambario temperatūros, kai kaskart reikia tik dalies tirpalo. Geriau paimti naudojamą kiekį ir po paėmimo iškart gražinti flakonų į 2–8 °C temperatūrą. „Washing NX“ (WS) yra naudojamas oocitų vitrifikacijai.
2. Pripildykite skystojo azoto talpyklę skystojo azoto (LN<sub>2</sub>) tiek, kad būtų pasiektas 4 colių gylis arba galėtumėte visiškai panardinti kriogeninį mėgintuvėlį ant laikiklio, ir padėkite netoli mikroskopo. Prityvinkite kriogeninį mėgintuvėlį arba taurę (neuždengtą) prie kriogeninio laikiklio apatinio gnybto ir panardinkite į skystąjį azotą paruošdami laikyti vitrifikuotus bandinius.
3. Nustatykite norimų vitrifikuoti bandinių skaičių.
4. Pažymėkite ant kiekvieno sterilios petri lėkštelės (ar dangtelio) ir kriogeninio saugojimo įrenginio reikalingą informaciją.
5. Prieš pradėdami procedūrą, atidžiai patikrinkite vitrifikavimo prietaisą.
6. Prieš naudodami švelniai pavartykite kiekvieną ES ir VS flakoną, kad sumaišytumėte ju turinį.
7. Lėkštelę su tirpalų lašeliais vitrifikacijos procedūrai paruoškite taip:

### A. OOCITŲ (MI) vitrifikacijos protokolas

1 PASTABA. Paimti oocitai yra atidengiami hialuronidaze, siekiant patvirtinti, kad jie yra MI.

2 PASTABA. Embrionų vitrifikacijos protokola rasite B skyriuje.

1. Steriliai užlašinkite 20 µl WS, ES1 ir ES2 lašą arti vienas kito ir ES3 ant apversto sterilios petri lėkštelės dangtelio, kaip parodyta 1 pav., ir padėkite lėkštelę ant mikroskopo stalielio:
  - vienas 20 µl WS lašas;
  - trys 20 µl (iš viso 60 µl) ES (ES1, ES2, ES3) lašai.
2. Išimkite pasėlio lėkštelę, kurioje yra MI oocitai, iš inkubatoriaus ir po mikroskopu patikrinkite bandinių kokybę. Jeigu galima, rinkitės tik geriausios kokybės MI stadijos oocitą (-us).  
PERSPĖJIMAS. Nustatovint WS, ES ir VS lašeliuose minimaliai sumažinkite šviesos poveikį bandiniui (-iams).
3. Perkelkite oocitą (iki 2 vienu metu) su minimaliu kiekiu terpės iš pasėlio lėkštelės (inkubatorijoje) į 20 µl WS lašą vienai minutei.
4. Perkėlimo pipetės antgaliu suliekiate WS lašą su ES1 (žr. 1 pav., 1 rodyklė) ir leiskite dviems tirpalams savaime susimaišyti 2 minutes.
5. Tada įlašinkite ES2 lašą (2 rodyklė) į anksčiau sulietus lašus ir palikite 2 minutėms.
6. Perkelkite oocitą (-us) su minimaliu tirpalo kiekiu iš sulieto lašo į ES3 lašą 6–10 minučių.  
Pastaba: oocito (-ų) nusistovėjimas ES3 yra užbaigtas, kai skaidriojo apvalkalo ir perivitelinės erdmės tarpo storis yra lygus. Paprastai oocitas (-ai) nusės į lašą apačią per 3 minutes.
7. Nustatovint ES3 steriliai paimkite vieną (1) 50 µl VS lašą prieš baigiant nusistovėti ir paruoškite pasirinktą vitrifikacijos prietaisą įdėti (2 pav.).
8. Šiuos veiksmus (9–13) reikia atlikti per 80–110 sekundžių.  
PERSPĖJIMAS. VS poveikis bandiniams turi būti ribotas, kad būtų apsaugota nuo citotoksiškumo. Bandinys (-iai) linkęs (-ę) plūduriuoti VS, todėl pakoreguokite centrą per mikroskopą, kad nuolat galėtumėte stebėti poveikį ir šalia turėkite perkėlimo pipetės antgalį, kad galėtumėte garantuoti greitą perkėlimą tarp lašelių. Žr. 2 pav.
9. Iškart prieš baigiant nusistovėti ES, nuskalaukite ir pripildykite perkėlimo pipetės antgalį VS ir įtraukite bandinį (-ius) su minimaliu ES tūriu į pipetės antgalį; perkelkite į VS lašą 50–60 sekundžių. Išleiskite oocitus į VS apačią. Išleidžiant oocitai išplauks į VS viršų. Norėdami užtikrinti visišką nuplovimą VS, švelniai perkelkite oocitus pipete atgal į VS dugno vidurį.  
Šio proceso metu oocitai bus dehidratuoti ir vėl išdils.
10. Pakraukite ir užsandarinkite vitrifikacijos prietaisą, kaip nurodyta gamintojo.
11. Sudėkite vitrifikuotą (-us) bandinį (-ius) į pasirinktą vitrifikacijos prietaisą į panardintą LN<sub>2</sub>, pripildytą kriogeninį mėgintuvėlį arba taurę (ant kriogeninio laikiklio) 3 pav. Uždėkite ant kriogeninio mėgintuvėlio (ar taurės) dangtelį arba pritvirtinkite apverstą prie kito neuždengto kriogeninio mėgintuvėlio, kad galėtumėte uždaryti vitrifikuotą prietaisą skystajame azote.
12. Perkelkite LN<sub>2</sub> talpyklę arti LN<sub>2</sub> kriosaldiklio ir kriogeninį laikiklį su visu turiniu į kriosaldiklį ilgalaikiam saugojimui.

### B. EMBRIONŲ (NUO PN Iki blastocistos) vitrifikacijos protokolas

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



5. Iškart prieš baigiant nusistovėti ES, nuskalaukite ir pripildykite perkėlimo pipetės atgalį VS ir įtraukite bandinį (-ius) su minimaliu ES tūriu į pipetės atgalį; perkelkite į VS lašą mažiausiai 30 sekundžių. Išleiskite embrionus į VS apačią. Išleidžiant embrionai išplauks į VS viršų. Norėdami užtikrinti visišką nuplovimą VS, švelniai perkelkite embrionus pipete atgal į VS dugno vidurį.  
2 PASTABA. Šio proceso metu embrionai bus dehidratuoti ir vėl iškils.
6. Pakraukite ir užsandarinkite vitrifikacijos prietaisą, kaip nurodyta gamintojo.
7. Sudėkite vitrifikuotą pasirinktą vitrifikacijos prietaisą į panardinatą LN<sub>2</sub>, pripildytą kriogeninį mėgintuvėlį arba taurę (ant kriogeninio laikiklio) 3 pav. Uždėkite ant kriogeninio mėgintuvėlio (ar taurės) dangtelį arba pritvirtinkite apverstą prie kito neuždengto kriogeninio mėgintuvėlio, kad galėtumėte uždaryti vitrifikuotą prietaisą skystajame azote.
8. Perkelkite LN<sub>2</sub> talpyklę arti LN<sub>2</sub> kriošaldiklio ir kriogeninį laikiklį su visu turiniu už kriošaldiklį ilgalaikiam saugojimui.

Išsamesnių šių produktų naudojimo gairių kiekviena laboratorija turi ieškoti savo vidaus darbo tvarkos taisyklėse ir metodiniuose nurodymuose, specialiai parengtuose ir optimizuotuose pagal atskiros medicininės programos nuostatas.

### LAIKYMO SĄLYGOS IR STABILUMAS

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

Atidarę talpykles, terpės nenaudokite ilgiau kaip keturiolika (14) dienų.

Kadangi produkte yra žmogaus kilmės medžiagos, laikant gali susidaryti tam tikrų kietųjų dalelių. Nežinoma, ar šios kietosios dalelės turi įtakos produkto veikimui.

### ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

Ši priemonė yra skirta naudoti darbuotojams, išmokytiems atlikti pagalbinio apvaisinimo procedūras. Tos procedūros apima priemonės taikymą pagal numatytąją paskirtį.

Šią priemonę naudojanti įstaiga yra atsakinga už produkto atsekamumo duomenų kaupimą ir privalo laikytis savo šalies norminių atsekamumo užtikrinimo reikalavimų, jei taikoma.

Negalima naudoti jokio tirpalo flakono, jei yra pažeidimų, nuotėkis, matyti kietųjų dalelių ar skystis atrodo drumstas. Išmeskite produktą pagal taikomus reagentus.

Norint išvengti užkrėtimo, naudojimo metu reikia laikytis metodinių aseptikos reikalavimų.

Šiuo metu mokslinėje literatūroje nurodoma, kad ilgalaikis vitrifikacijos poveikis oocitams ir embrionams yra nežinomas.

Nenaudokite produkto, jei pažeista sterili buteliuko pakuotė.

ES. Taikomos standartinės priemonės siekiant išvengti infekcijų, kai naudojami iš žmogaus kraujo arba plazmos paruošti vaistiniai preparatai – donorų atranka, individualių donorinių ėminių ir jungtinių plazmos banko mėginių tikrinimas pagal specifinius infekcijų žymenis bei veiksmingi gamybos etapai virusams inaktyvinti arba sunaikinti. Nepaisant to, kai naudojami iš žmogaus kraujo ar plazmos pagaminti vaistiniai preparatai, negalima visiškai atmesti infekuotų medžiagų perdavimo galimybes. Tai taip pat taikytina nežinomiems ar atsirandantiems virusams ir kitoms patogeninėms medžiagoms. Nėra įrodymų apie virusų perdavimą naudojant Europos farmakopėjos specifikacijas atitinkantį albuminą, pagaminatą taikant patvirtintus apdoravimo metodus. Primitytinai rekomenduojama kiekvieną kartą skiriant pacientui „FUJIFILM Irvine Scientific, Inc.“ reprodukcinę mitybos terpę užrašyti produkto pavadinimą ir partijos numerį, kad būtų galima susieti pacientą ir produkto partiją.

JAV. Šio produkto sudėtyje yra žmogaus serumo albumino (ŽSA). Šį produktą gaminant naudotos žmogaus kilmės medžiagos buvo ištirtos taikant JAV maisto ir vaistų administracijos (FDA) patvirtintus reagentų rinkinius, ir nustatyta, kad jos nereaktyvios hepatito C viruso (HCV) antikūnų atžvilgiu ir žmogaus imunodeficitinio viruso (ŽIV) antikūnų atžvilgiu. Visgi joks tyrimo metodas nesuteikia visapusiškų garantijų, kad iš žmogaus kilmės medžiagų pagamintuose preparatuose nėra infekcinių ligų sukėlėjų. Visas žmogiškos kilmės medžiagas tvarkykite taip, lyg jos galėtų pernešti infekciją, naudodami visuotines atsargumo priemones. Taip pat buvo ištirta, ar preparatų žaliavos medžiagų donorai nėra užsikrėtę Krocifeldo-Jakobo liga.

### KONTRAINDIKACIJOS

Produkto sudėtyje yra gentamicino sulfato. Būtina imtis tinkamų atsargumo priemonių užtikrinant, kad pacientas nėra alergiškas šiam antibiotikui.



## TÜRKÇE

**AB İÇİN DİKKAT:** Sadece Mesleki Kullanım İçindir.

### KULLANIM AMACI

Vit Kit - Freeze NX ürününün yardımcı üreme işlemlerinde gün 3 klivaj evresi embriyolar ve blastokist evresi embriyolara kadar pronükleer (PN) zigotlar ve insan oositlerinin (MII) vitrifikasyonu ve saklanması için kullanılması amaçlanmıştır.

### CİHAZ TANIMI

**Equilibration NX-ES**, Gentamisin Sülfat, %7,5 (h/h) DMSO ve etilen glikol (her biri) ve %20 (h/h) Dextran Serum Supplement (DSS) içeren çift tamponlu (HEPES ve MOPS) bir Continuous Single Culture medium (CSCM) solüsyonudur.

**Vitrification NX-VS**, gentamisin sülfat, %15 (h/h) DMSO ve etilen glikol (her biri), %20 (h/h) DSS ve 0,5 M Trehaloz içeren bir çift tamponlu (HEPES ve MOPS) CSCM solüsyonudur.

**Washing NX-WS**, Gentamisin Sülfat ve %20 DSS içeren çift tamponlu (HEPES ve MOPS) bir CSCM solüsyonudur.

DSS, 50 mg/mL terapötik sınıf İnsan Serum Albumini (İSA) ve 20 mg/mL Dekstrandan oluşan bir protein takviyesidir. DSS, 10 mg/mL HSA ve 4 mg/mL Dekstran son konsantrasyonu için Vit Kit – Freeze NX içinde %20 (h/h) değerinde kullanılır.

Bu solüsyonlar kademeli mikrodamlı vitrifikasyon protokolüne göre sırayla kullanılacaktır.

### BİLEŞİM

#### Tuzlar ve İyonlar

Potasyum Fosfat  
Sodyum Klorür  
Potasyum Klorür  
Magnezyum Sülfat  
Kalsiyum Klorür

#### Amino Asitler

L-Arjinin  
Glisin  
L-Histidin  
L-Lizin  
L-Prolin  
L-Tirozin  
L-Alanin  
L-Aspartik Asit  
L-Asparajin  
L-Glutamik Asit  
L-Izoloşin  
L-Löşin  
L-Alanil-L-Glutamin  
L-Metiyonin

L-Fenilalanin  
L-Serin  
L-Treonin  
L-Triptofan  
L-Valin  
L-Sistin

#### Antioksidanlar

Sodyum Sitrat  
EDTA

#### Antibiyotikler

Gentamisin Sülfat

#### Enerji Substratları

Dekstroz  
Sodyum Piruvat  
Sodyum Laktat

#### Protein

İnsan Serum Albumini, İSA

#### Kriyokoruyucular

Dekstran  
Trehaloz  
Etilen Glikol  
Dimetilsülfoksit

#### Tampon

Sodyum Bikarbonat  
HEPES  
MOPS

### KALİTE GÜVENÇE

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

Her Vit Kit - Freeze NX lotu şu testlerden geçer:

- Endotoksin, Limulus Ameboisit Lizat (LAL) metodolojisi ( $\leq 0,6$  EU/mL), USP Bakteriye Endotoksinler <85> ve Ph. Eur. 2.6.14
- Fare Embriyo Testi (tek hücre) ( $\geq$  %80 genişlemiş blastokist)
- Mevcut USP Sterilite Testi <71> ile sterilite, Ph. Eur. 3.2 (Geçti)

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

### GEREKLİ AMA DAHİL EDİLMİYEN MATERYAL

- Tercih edilen vitrifikasyon cihazı
- Steril petri tabakları (50 X 9 mm, Falcon 351006 veya eşdeğeri)
- Kriyotüpler (4.5 mL) veya gobletler ve cryocane ürünleri
- Oosit vitrifikasyonu için Hyaluronidase (Katalog #90101)
- Tek kullanımlık eldivenler
- Transfer pipetleri (iç tüp çapı ~200  $\mu$ m olan çekme cam pipetler veya mikropipet uçları)
- Cımbız veya forseps
- Kronometre veya zamanlayıcı
- Sıvı nitrojen rezervuarı (kapaklı tank veya styrofoam kap, 1-2 L hacim)
- Sıvı nitrojen (rezervuarda 4 inç derinlik elde etmeye yetecek hacim)

### KULLANMA TALİMATI

Vit Kit - Freeze NX bileşen gereklilikleri (uygulama başına):

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ L, Oosit Vitrifikasyonu Protokolü için  
Veya  
50  $\mu$ L, Embriyo Vitrifikasyonu Protokolü için
- Vitrification NX-VS (VS):  
50  $\mu$ L, herhangi bir Vitrifikasyon Protokolü için
- Washing NX-WS (WS):  
20  $\mu$ L, Oosit Vitrifikasyonu Protokolü için

## VİTRİFİKASYON PROTOKOLÜ:

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

1. Kullanılacak ES, VS ve WS miktarını oda sıcaklığına (20-27°C) getirin.

NOT: Her seferinde solüsyonun bir kısmı gerektiğinde tüm ES, VS ve WS flakonlarını tekrar tekrar oda sıcaklığına getirmekten kaçının. Kullanılacak miktarı ayırıp bu ayırma işleminden hemen sonra flakonları tekrar 2-8°C'ye koymak daha iyi olur. Washing NX (WS) oosit vitrifikasyonu için kullanılır.

2. Sıvı nitrojen rezervuarını sıvı nitrojen (LN<sub>2</sub>) ile 4 inç derinlik elde edecek veya çubuk üzerindeki kriyotüpü tamamen batırmaya yetecek bir derinliğe kadar doldurun ve mikroskopa yakın olarak yerleştirin. Bir cryocane alt klempine bir kriyotüp veya goblet (kapaksız) takın ve vitriyifi numunelerin saklanması için hazırlık olarak sıvı nitrojene batırın.
3. Vitriyifiye edilecek numune sayısını belirleyin.
4. Her steril petri tabağı (veya kapağı) ve kriyosaklama cihazını gerekli bilgilerle etiketleyin.
5. İşleme başlamadan önce vitrifikasyon cihazını dikkatle inceleyin.
6. Kullanım öncesinde içeriği karıştırmak için her ES ve VS flakonunu yavaşça ters düz edin.
7. Vitrifikasyon işlemi için solüsyon damlaları içeren tabağı şu şekilde hazırlayın:

### A. OOSİT (MII) Vitrifikasyonu Protokolü:

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

NOT 2: Embriyo vitrifikasyonu protokolü için bakınız Bölüm B.

1. Şekil 1'de gösterildiği gibi steril petri tabağının ters çevrilmiş kapağına ES3 ve ES2'den 20 µL damlaları aseptik olarak koyun ve tabağı mikroskop tablasına yerleştirin.
  - bir 20 µL WS damlası
  - üç 20 µL damla (toplam 60 µL) ES (ES1, ES2, ES3)
2. İnkübatörden MII oositlerini içeren kültür tabağını alın ve mikroskop altında numunelerin kalitesini kontrol edin. Mümkünse sadece en iyi kaliteye sahip MII evresi oositli/oositleri seçin.  
DİKKAT: WS, ES ve VS damlalarında dengeleme sırasında numunenin/numunelerin ışığa maruz kalmasını en aza indirin.
3. Oosit (her seferinde iki adede kadar olmak üzere) minimum vasat hacmiyle kültür tabağından (İnkübatörde) 20 µL WS damlasına bir dakikalığına aktarın.
4. Transfer pipetinin ucuna ES1 ve WS damlasını birleştirin (Bakınız Şekil 1, ok 1) ve 2 dakika boyunca iki solüsyonun kendiliğinden karışmasını bekleyin.
5. Sonra ES2 damlasını (ok 2) daha önce birleştirilmiş damlalarla birleştirin ve 2 dakika böyle bırakın.
6. Oosit/oositleri birleştirilmiş damladan ES3 damlasına minimum solüsyon hacmiyle 6-10 dakikalığına aktarın.  
Not: zona pellusida ve perivitellin boşluk kalınlığı eşit olduğunda oosit/oositlerin ES3 içinde dengelemesi tamamlanmıştır. Oosit/oositler tipik olarak 3 dakika içinde damlanın dibine çökecektir.
7. ES3 içindeki dengeleme süresi sırasında tam dengeleme öncesinde aseptik olarak bir (1) 50 µL VS damlası koyun ve tercih edilen Vitrifikasyon cihazını yükleme için hazırlayın (Şekil 2).
8. Aşağıdaki adımlar (9-13) 80-110 saniye içinde tamamlanmalıdır.  
DİKKAT: Sitotoksikiteyi önlemek için numunelerin VS'ye maruz kalması sınırlanmalıdır. Numune/numuneler VS'de yüzme eğiliminde olduğundan mikroskopun odağını, maruz bırakma sırasında sürekli görüntüleme sağlayacak şekilde ayarlayın ve damlalar arasında hızlı aktarmayı sağlamak üzere transfer pipetinin ucunu yakın tutun. Bakınız Şekil 2.
9. ES içinde dengelemenin tamamlanmasından hemen önce transfer pipetini VS ile yıkayıp doldurun ve pipet ucuna minimum ES hacmiyle birlikte numuneyi/numuneleri çekip VS damlası içine 50-60 saniyelikliğine aktarın. Oositleri VS dibine bırakın. Koyarken oositler VS yüzeyine çıkacaktır. VS ile tam yıkamadan emin olmak için oositleri pipetleme yoluyla tekrar VS alt ortasına getirin. Bu işlem sırasında oositler dehidrate olacak ve tekrar yüzecektir.
10. Vitrifikasyon cihazını üreticinin talimat verdiği şekilde yükleyin ve mühürlüyorsunuz.
11. Tercih edilen Vitrifikasyon cihazında vitriyifiye numuneyi/numuneleri sıvıya batırılmış, LN<sub>2</sub> doldurulmuş kriyotüp veya goblete (cryocane üzerinde) yerleştirin - Şekil 3. Vitriyifiye cihazı sıvı nitrojende sabitlemek için kriyotüp (veya goblet) kapağını kapatın veya başka bir kapaksız kriyotüple birlikte ters olarak tuturun.
12. LN<sub>2</sub> rezervuarını LN<sub>2</sub> kriyodondurucusuna yaklaştırın ve içindekilerle birlikte cryocane ürününü uzun dönemli saklama için kriyodondurucuya aktarın.

### B. EMBRİYOLAR (PN'den Blastokiste) Vitrifikasyonu Protokolü:

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

5. ES içinde dengelenmenin tamamlanmasından hemen önce transfer pipetini VS ile yıkayıp doldurun ve pipet ucuna minimum ES hacmiyle birlikte numuneyi/numuneleri çekip VS damlası içine minimum 30 saniyelğine aktarın. Embriyoları VS dibine bırakın. Koyarken embriyolar VS yüzeyine çıkacaktır. VS ile tam yıkamadan emin olmak için embriyoları pipetleme yoluyla tekrar VS alt ortasına getirin.  
NOT 2: Bu işlem sırasında embriyolar dehidrate olacak ve tekrar yüzecektir.
6. Vitrifikasyon cihazını üreticinin talimat verdiği şekilde yükleyin ve mühürleyin.
7. Tercih edilen Vitrifikasyon cihazında vitrifiye numuneyi/numuneleri sıvıya batırılmış LN<sub>2</sub> doldurulmuş kriyotüp veya goblete (cryocane üzerinde) yerleştirin - Şekil 3. Vitrifiye cihazı sıvı nitrojende sabitlemek için kriyotüp (veya goblet) kapağını kapatın veya başka bir kapaksız kriyotüple birlikte ters olarak tuturun.
8. LN<sub>2</sub> rezervuarını LN<sub>2</sub> kriyodondurucusuna yaklaştırın ve içindekilerle birlikte cryocane ürününü uzun dönemli saklama için kriyodondurucuya aktarın.

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

### **SAKLAMA TALİMATI VE STABİLİTE**

Açılmamış flakonları 2°C ile 8°C arasında buzdolabında saklayın. Talimattaki gibi saklandığında Vit Kit – Freeze NX solüsyonları flakon etiketlerinde gösterilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

Kaplar açıldıktan sonra vasatı on dört (14) günden fazla kullanmayın.

Üründe insan kaynaklı materyal bulunduğundan saklama sırasında bir miktar partikül madde gelişebilir. Bu partikül madde tipinin ürün performansı üzerine bir etkisi bilinmemektedir.

### **ÖNLEMLER VE UYARILAR**

Bu cihazın yardımcı üreme işlemleri konusunda eğitimli personelce kullanılması amaçlanmıştır. Bu işlemlere bu cihazın kullanımının amaçlandığı, amaçlanmış uygulama dahilidir.

Bu cihazı kullanan tesis, ürünün izlenebilirliğinin sürdürülmesinden sorumludur ve geçerliyse izlenebilirlikle ilgili ulusal düzenlemelere uymak zorundadır.

Hasar, sızıntı, partikül madde veya bulanıklık bulguları gösteren herhangi bir solüsyon flakonunu kullanmayın. Ürünü ilgili düzenlemelerle uyumlu olarak atın.

Kontaminasyon sorunlarından kaçınmak için aseptik tekniklerle kullanın.

Şu anda araştırma literatürü vitrifikasyonun oositler ve embriyolar üzerinde uzun dönemli etkilerinin halen bilinmemekte olduğuna işaret etmektedir.

Steril ambalajın olumsuz etkilendiği herhangi bir şeyi kullanmayın.

AB: İnsan kanı veya plazmasından hazırlanan tıbbi ürünlerin kullanımından kaynaklanan enfeksiyonların önlenmesi için alınan standart önlemler arasında donörlerin seçimi, bireysel bağışların ve plazma havuzlarının belirli enfeksiyon göstergeleri için takibi ve virüslerin inaktivasyonu/uzaklaştırılması için etkili üretim aşamalarının kullanılması yer almaktadır. Bunlara rağmen insan kanı veya plazmasından hazırlanan tıbbi ürünler uygulandığında bulaşıcı ajanlar iletmeye olasıdır. Bu ayrıca bilinmeyen veya yeni çıkan virüsler ve diğer patojenler için de geçerlidir. Yerleşmiş süreçlerle Avrupa Farmakopesi spesifikasyonlarına göre üretilen albuminle ispatlanmış virüs bulaşması raporu yoktur. Bir FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. Üreme Vasatı Ürünleri kültür vasatının bir hastaya her uygulanmasında ürünün isim ve parti numarasının hasta ile ürün partisi arasında bir bağlantıyı sürdürmek açısından kaydedilmesi kuvvetle önerilir.

ABD: Bu ürün İnsan Serum Albumini (İSA) içerir. Bu ürünün üretilmesinde kullanılan insan kaynaklı materyal FDA lisanslı kitlelerle test edilmiş ve Hepatit C (HCV) antikorları ve İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV) antikorları açısından reaktif olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte hiçbir test yöntemi insan kaynaklarından türetilen ürünlerin bulaşıcı olmadığı konusunda tam güvence sunmaz. Tüm insan kaynaklı materyali evrensel önlemler kullanılarak ve enfeksiyon bulaştırabilirliği gibi kullanın. Kaynak materyal donörleri CJD için de taranmıştır.

### **KONTRENDİKASYON**

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



# SLOVENČINA

**UPOZORNENIE V EÚ:** Len na profesionálne použitie.

## URČENÉ POUŽITIE

Súprava Vit Kit – Freeze NX je určená na použitie pri postupoch asistovanej reprodukcie na vitrifikáciu a uchovávanie ľudských oocytov (MI), pronukleárných (PN) zygot až po 3-dňové embryá v štádiu ryhovania a embryí v štádiu blastocysty.

## POPIS ZARIADENIA

**Equilibration NX-ES** je dvojito pufrovaný roztok (HEPES a MOPS) média Continuous Single Culture Medium (CSCM) obsahujúci gentamicínsulfát, po 7,5 % (v/v) DMSO a etylénglykolu, a 20 % (v/v) doplnku so sérovým dextranom (DSS).

**Vitrification NX-VS** je dvojito pufrovaný roztok (HEPES a MOPS) média CSCM obsahujúci gentamicínsulfát, po 15 % (v/v) DMSO a etylénglykolu, 20 % (v/v) DSS a 0,5 M trehalózy.

**Washing NX-WS (WS)** je dvojito pufrovaný roztok (HEPES a MOPS) média CSCM, obsahujúci gentamicínsulfát a 20 % DSS.

DSS je bielkovinový doplnok, skladajúci sa z 50 mg/ml ľudského sérového albumínu (HSA) terapeutickej kvality a 20 mg/ml dextranu. DSS sa používa pri 20% (v/v) v súprave Vit Kit – Freeze NX na výslednú koncentráciu 10 mg/ml HSA a 4 mg/ml dextranu.

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

## ZLOŽENIE

### Soli a ióny

fosforečnan draselný  
chlorid sodný  
chlorid draselný  
síran horečnatý  
chlorid vápenatý

### Pufer

hydrogénuhličitan sodný  
HEPES  
MOPS

### Aminokyseliny

L-arginín  
glycín  
L-histidín  
L-lyzín  
L-prolín  
L-tyrozín  
L-alanín  
L-kyselina aspartová  
L-asparagín  
kyselina L-glutamová  
L-izoleukín  
L-leukín  
L-alanyl-L-glutamín  
L-metionín

### L-fenylalanín

L-serín  
L-treonín  
L-tryptofán  
L-valín  
L-cystín

### Antioxidanty

citrát sodný  
EDTA

### Antibiotiká

gentamicínsulfát

### Energetické substráty

dextróza  
pyruvát sodný  
laktát sodný

### Bielkoviny

ľudský sérový albumín, HSA

### Kryoprotektanty

dextran  
trehalóza  
etylénglykol  
dimetylсульfoxid

## KONTROLA KVALITY

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

Každá šarža Vit Kit – Freeze NX prešla nasledujúcimi skúškami:

- endotoxín pomocou testu amébocytového lyzátu z ostrorepa amerického (LAL) (< 0,6 EU/ml) podľa bakteriálnych endotoxínov USP <85> a Európskeho liekopisu 2.6.14
- test sterility embryí myši (v jednej bunke) (≥ 80 % expandovanej blastocysty)
- sterilita pomocou aktuálneho testu sterility USP <71>, Európskeho liekopisu 3.2 (splnené)

Všetky výsledky sa zaznamenávajú na certifikát analýzy pre špecifickú šaržu, ktorý je dostupný na požiadanie.

## VYŽADOVANÉ, NO NEDODÁVANÉ MATERIÁLY

- Vitrifikačné zariadenie podľa vlastnej voľby
- Sterilné Petriho misky (50 x 9 mm, Falcon 351006 alebo ekvivalentné)
- Kryoskúmavky (4,5 ml) alebo poháriky alebo kryotičinky
- Hyaluronidáza (katalógové č. 90101) na vitrifikáciu oocytov
- Jednorazové rukavice
- Prenosové pipety (pipety z tahaného skla alebo špičky mikropipet s vnútorným priemerom špičky ~200 µm)
- Pinzeta alebo klieštičky
- Stopky alebo časomer
- Zásobník tekutého dusíka (Dewarova alebo polystyrénová nádoba s vekom, objem 1 – 2 l)
- Tekutý dusík (dostatočný objem na dosiahnutie hĺbky 4 palcov v zásobníku)

## NÁVOD NA POUŽITIE

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60 µl na vitrifikačný protokol pre oocyty  
alebo  
50 µl na vitrifikačný protokol pre embryá
- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl na ľubovoľný vitrifikačný protokol
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl na vitrifikačný protokol pre oocyty

## VITRIFIKAČNÝ PROTOKOL:

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

1. Množstvo roztokov ES, VS a WS, ktoré sa má použiť, vytemperujte na izbovú teplotu (20 °C – 27 °C).

POZNÁMKA: Celé skúmavky s roztokmi ES, VS a WS opakovane netemperujte na izbovú teplotu, keď je zakaždým potrebná len časť roztoku. Je lepšie alikvotovať množstvo, ktoré sa má použiť, a skúmavky vrátiť do teploty 2 °C – 8 °C hneď po alikvotovaní. Roztok Washing NX (WS) sa používa na vitrifikáciu oocytov.

2. Zásobník tekutého dusíka naplňte tekutým dusíkom (LN<sub>2</sub>) – dostatočným množstvom, aby sa dosiahla hĺbka 4 palce alebo na úplné ponorenie kryoskúmavky na tyčinke – a položte ho do blízkości mikroskopu. Mikroskúmavku alebo pohárik (bez vrchnáka) pripievňte k spodnej svorke kryotučinky a ponorte ho do tekutého dusíka v rámci prípravy na uchovávanie vitrifikovaných vzoriek.
3. Stanovte počet vzoriek, ktoré sa idú vitrifikovať.
4. Každú sterilnú Petriho misku (alebo vrchnák) a zariadenie na kryochovávanie označte potrebnými informáciami.
5. Skôr, než začnete postup, pozorne prezrite vitrificačné zariadenie.
6. Každú skúmavku s roztokmi ES a VS pred použitím jemne preklepte, aby sa premiešal obsah.
7. Pripravte misku s kvapkami roztokov na vitrificačný postup nasledovným spôsobom:

### A. Vitrificačný protokol pre OOCYTY (MII):

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

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

1. Asepticky nadávkujte 20 µl kvapku roztokov WS, ES1 a ES2 do tesnej blízkosti a ES3 na prevrátený vrchnák sterilnej Petriho misky tak, ako je ukázané na obrázku 1, a misku položte na stolík mikroskopu:
  - jednu 20 µl kvapku roztoku WS
  - tri 20 µl kvapky (60 µl celkom) roztoku ES (ES1, ES2, ES3)

2. Kultivačnú misku obsahujúcu MII oocyty vyberte z inkubátora a pod mikroskopom skontrolujte kvalitu vzoriek. Podľa možnosti vyberte len najkvalitnejšie oocyty v štádiu MII.

UPOZORNENIE: Počas ustálenia v kvapkách WS, ES a VS minimalizujte expozíciu vzorky svetlu.

3. Oocyt preneste (maximálne po 2 odrazu) s minimálnym množstvom média z kultivačnej misky (v inkubátore) do 20 µl kvapky roztoku WS na jednu minútu.

4. Kvapky roztokov WS a ES1 (pozri obrázok 1, šípka 1) spojíte špičkou prenosovej pipety a nechajte, aby sa tieto dva roztoky spontánne miešali 2 minúty.

5. Potom spojíte kvapku roztoku ES2 (šípka 2) s už predtým spojenými kvapkami a nechajte postáť 2 minúty.

6. Oocyty preneste s minimálnym množstvom roztoku zo spojenej kvapky do kvapky ES3 na 6 – 10 minút.

Poznámka: ustálenie oocytov v ES3 je kompletne, keď sa hrúbka zóna pellucida vyrovná s perivitelinným priestorom. Oocyty usadnú na dno kvapky typicky do 3 minút.

7. Počas doby ustálenia v ES3 asepticky nadávkujte jednu (1) 50 µl kvapku roztoku VS pred kompletným ustálením a pripravte vitrificačné zariadenie podľa vlastnej voľby na naplnenie (obrázok 2):

8. Nasledujúce kroky (9 – 13) je potrebné vykonať za 80 – 110 sekúnd.

UPOZORNENIE: Vystavenie vzoriek roztoku VS by sa malo obmedziť, aby sa zabránilo cytotoxicite. Vzorky majú tendenciu vznášať sa v roztoku VS, takže prispôbte zaostrenie mikroskopu tak, aby sa zabezpečilo kontinuálne zobrazenie počas expozície, a špičku prenosovej pipety držte v blízkosti, aby sa zaistil rýchly prenos medzi kvapkami. Pozri obrázok 2.

9. Špičku prenosovej pipety opláchnite a naplňte roztokom VS tesne pred dokončením ustálenia v roztoku ES, natiahnite vzorku s minimálnym objemom roztoku ES do špičky pipety a preneste ju do kvapky roztoku VS na 50 – 60 sekúnd. Oocyty vypustíte na dno roztoku VS. Pri vypúšťaní oocytov vyplávajú na povrch roztoku VS. Aby sa zaistilo úplné opláchnutie roztokom VS, oocyty jemne posuňte pipetou naspäť do stredu dna roztoku VS.

Počas tohto procesu budú oocyty dehydrované a znovu vyplávajú.

10. Vitrificačné zariadenie naplňte a zapečte podľa pokynov výrobcu.

11. Vitrifikované vzorky umiestnite na vitrificačné zariadenie podľa vlastnej voľby do ponorenej kryoskúmavky alebo pohárika naplneného LN<sub>2</sub> (na kryotučinke) – obrázok 3. Kryoskúmavku (alebo pohárik) zatvorte alebo pripievňte hore dnom k inej nezatvorenej kryoskúmavke, aby sa vitrifikované zariadenie zaistilo v tekutom dusíku.

12. Zásobník LN<sub>2</sub> presuňte bližšie ku kryomrazičke LN<sub>2</sub> a kryotučinku s obsahom preneste do kryomrazičky na dlhodobé uchovávanie.

### B. Vitrificačný protokol pre EMBRYÁ (PN až blastocysta):

1. Asepticky nadávkujte jednu 50 µl kvapku roztoku ES na prevrátený vrchnák Petriho misky (obrázok 4).

2. Kultivačnú misku s embryami vyberte z inkubátora a pod mikroskopom skontrolujte kvalitu vzorky. Podľa možnosti vyberte len najkvalitnejšie embryá na vitrifikáciu.

3. Vzorku opatrne preneste (maximálne po dve odrazu) s minimálnym množstvom média z kultivačnej misky do kvapky roztoku ES a zapnite časovač.

Embryá by sa mali ustáliť v kvapke ES pomaly voľným pádom po dobu 6 – 10 minút.

POZNÁMKA 1: Vzorka sa scvrkne a potom sa postupne vráti na pôvodnú veľkosť, čo označí dokončenie ustálenia.

UPOZORNENIE: Počas ustálenia v kvapkách ES a VS minimalizujte expozíciu vzorky svetlu.

4. Počas tejto doby ustálenia v ES asepticky nadávkujte jednu 50 µl kvapku roztoku VS tak, ako je ukázané na obrázku 4, a pripravte vitrificačné zariadenie podľa vlastnej voľby na naplnenie.



5. Špičku prenosovej pipety opláchnite a naplňte roztokom VS tesne pred dokončením ustálenia v roztoku ES, natiahnite vzorku s minimálnym objemom roztoku ES do špičky pipety a preneste ju do kvapky roztoku VS na minimálne 30 sekúnd. Embryá vypustite na dno roztoku VS. Pri vypúšťaní embryá vyplávajú na povrch roztoku VS. Aby sa zaistilo úplné opláchnutie roztokom VS, embryá jemne posuňte pipetou naspäť do stredu dna roztoku VS.
- POZNÁMKA 2: Počas tohto procesu budú embryá dehydrované a znovu vyplávajú.
6. Vitriřikačné zariadenie naplňte a zapečatíte podľa pokynov výrobcu.
7. Vitriřikačné zariadenie podľa vlastnej voľby vložte do ponorenej kryoskúmavky alebo pohárika naplneného LN<sub>2</sub> (na kryotyčinke), obrázok 3. Kryoskúmavku (alebo pohárik) zatvorte alebo pripevnite hore dnom k inej nezatvorenej kryoskúmavke, aby sa vitriřikované zariadenie zaistilo v tekutom dusíku.
8. Zásobník LN<sub>2</sub> presuňte bližšie ku kryomrazničke LN<sub>2</sub> a kryotyčinku s obsahom preneste do kryomrazničky na dlhodobé uchovávanie.

Ďalšie podrobnosti o použití týchto produktov by malo každé laboratórium čerpať zo svojich vlastných laboratórnych postupov a protokolov, ktoré boli špecificky vypracované a optimalizované pre váš individuálny medicínsky program.

#### **POKYNY PRE UCHOVÁVANIE A STABILITU**

Neotvorené skúmavky uchovávajú v chladničke pri teplote 2 °C až 8 °C. Pri odporúčanom skladovaní budú roztoky Vít Kit – Freeze NX stabilné až do dátumu expirácie vytlačeneho na označení skúmavky.

Médiá nepoužívajte dlhšie než štrnásť (14) dní po otvorení nádob.

Pretože v produkte je prítomný materiál z ľudských zdrojov, počas uchovávanía sa môžu vytvoriť určité tuhé častice. O týchto tuhých časticích nie je známe, že by mali vplyv na výkon produktu.

#### **BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VAROVANIA**

Táto pomôcka je určená na výhradné použitie personálom vyškoleným na postupy asistovanej reprodukcie. Tieto postupy zahŕňajú určené použitie, na ktoré je táto pomôcka určená.

Pracovisko používateľa tejto pomôcky zodpovedá za udržiavanie sledovateľnosti tohto produktu a musí v potrebných prípadoch spĺňať národné predpisy týkajúce sa sledovateľnosti.

Nepoužívajte žiadnu skúmavku s roztokom, v ktorom sa javia známky poškodenia, úniku, tuhých častíc alebo zákalu. Produkt likvidujte v súlade s príslušnými predpismi.

Aby nevznikli problémy s kontamináciou, vždy so zariadením manipulujte s použitím aseptických techník.

Podľa súčasnej výskumnej literatúry sú dlhodobé účinky vitriřikácie na oocyty a embryá stále neznáme.

Nepoužívajte žiadnu fľašu, ktorej sterilný obal bol narušený.

EÚ: Štandardné opatrenia na prevenciu infekcií v dôsledku použitia medicínskych produktov pripravených z ľudskej krvi alebo plazmy zahŕňajú výber darcov, skríning jednotlivých odberov a zdrojov plazmy na špecifické markery infekcií a zahŕňajú účinné výrobné kroky na inaktiváciu/odstránenie vírusov. Napriek tomu, keď sa podávajú medicínske produkty pripravené z ľudskej plazmy alebo krvi, nemožno úplne vylúčiť možnosť prenosu infekčných látok. Platí to aj pre neznáme alebo vyvíjajúce sa vírusy a iné patogény. Neboli hlásené žiadne dokázané prenosy vírusov s albumínom vyrobených podľa špecifikácií európskeho liekopisu pomocou zavedených postupov. Zakaždým, keď sa pacientovi podávajú kultivačné médiá produktov reprodukčných médií spoločnosti FUJIFILM Irvine Scientific, Inc., sa zaznamená názov a číslo šarže produktu, aby sa zachovalo prepojenie medzi pacientom a šaržou produktu.

USA: Tento produkt obsahuje ľudský sérový albumín (HSA). Materiál z ľudského zdroja, použitý na prípravu tohto produktu, bol testovaný pomocou súprav licencovaných agentúrou FDA a bolo zistené, že nie je reaktívny na protilátky proti vírusu hepatitídy C (HCV) a protilátky proti vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV). Žiadna testovacia metóda však nemôže úplne zaručiť, že produkty odvodené z ľudských zdrojov nie sú infekčné. So všetkými materiálmi z ľudských zdrojov zaobchádzajte, ako keby boli schopné prenosu infekcie, s použitím všeobecných bezpečnostných opatrení. Darcovia zdrojového materiálu tiež podstúpili skríning na CJD.

#### **KONTRAINDIKÁCIE**

Tento produkt obsahuje gentamicínsulfát. Musia sa vykonať primerané bezpečnostné opatrenia aby sa zaistilo, že pacientka nie je senzibilizovaná na toto antibiotikum.



## БЪЛГАРСКИ

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ЗА ЕС:** Само за професионална употреба.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Vit Kit - Freeze NX е предназначен за употреба при процедури за асистирана репродукция за витрификация и съхранение на човешки яйцеклетки (MII), пронуклеарни (PN) зиготи чрез ембриони в ден 3 на стадия на делене и ембриони в стадия на бластоцист.

### ОПИСАНИЕ НА ИЗДЕЛИЕТО

**Equilibration NX-ES** е двойно буферизиран разтвор (HEPES и MOPS) на непрекъсната единична културелна среда (Continuous Single Culture (CSCM)), съдържащ гентамицин сулфат, по 7,5% (v/v) DMSO и етилен гликол, както и 20% (v/v) серумен суплемент с декстран (DSS).

**Vitrification NX-VS** е двойно буферизиран разтвор (HEPES и MOPS) на CSCM, съдържащ гентамицин сулфат, по 15% (v/v) DMSO и етиленгликол, 20% (v/v) DSS и 0,5 M трехалоза.

**Washing NX-WS** е двойно буферизиран разтвор (HEPES и MOPS) на CSCM, съдържащ гентамицин сулфат и 20% DSS.

DSS е протеинов суплемент, състоящ се от 50 mg/mL терапевтичен клас човешки серумен албумин (HSA) и 20 mg/mL декстран. DSS се използва при 20% (v/v) във Vit Kit - Freeze NX за окончателна концентрация от 10 mg/mL HSA и 4 mg/mL декстран.

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

### СЪСТАВ

#### Соли и йони

Калиев фосфат  
Натриев хлорид  
Калиев хлорид  
Магнезиев сулфат  
Калциев хлорид

#### Аминокиселини

L-аргинин  
Глицин  
L-хистидин  
L-лизин  
L-пролин  
L-тирозин  
L-аланин  
L-аспарагинова киселина  
L-аспарагин  
L-глутаминова киселина  
L-изолевцин  
L-левцин  
L-аланил-L-глутамин  
L-метионин

L-фенилаланин  
L-серин  
L-треонин  
L-триптофан  
L-валин  
L-цистин

#### Енергийни субстрати

Декстроза  
Натриев пируват  
Натриев лактат

#### Буфер

Натриев бикарбонат  
HEPES  
MOPS

#### Антиоксиданти

Натриев цитрат  
EDTA

#### Протеин

Човешки серумен албумин,  
HSA

#### Криопротектори

Декстран  
Трехалоза  
Етилен гликол  
Диметил сулфоксид

### ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО

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

Всяка партида Vit Kit - Freeze NX преминава през следните изпитвания:

- Ендотоксин по метода на Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/mL) по USP бактериални ендотоксини <85> и Ph. Eur. 2.6.14
- Анализ на ембриони на мишки (една клетка) ( $\geq 80\%$  разширен бластоцист)
- стерилност чрез актуалния тест за стерилност по USP (фармакопейта на САЩ) <71>, Ph. Eur. 3.2 (валиден)

Всички резултати са посочени в конкретния за партидата Сертификат за анализ, който е достъпен по заявка.

### НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ВКЛЮЧЕНИ

- Избрано изделие за витрификация
- Стерилни петриеве блюда (50 X 9 mm, Falcon 351006 или еквивалентни)
- Криотуби (4,5 mL), бокали или криопръчки
- Хиалуронидаза (каталожен № 90101) за витрификация на яйцеклетки
- Ръкавици за еднократна употреба
- Трансферираци пипети (пипети със стъкло бутало или микропипетни върхове с вътрешен диаметър на върха ~200  $\mu$ m)
- Пинцети или форцепс
- Хронометър или таймер
- Резервоар за течен азот (Дюаров съд или стиропорен контейнер с капак с обем 1-2 L)
- Течен азот (в достатъчно количество, за да достигне 4 инча дълбочина в резервоара).

### УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

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

- Равновесен разтвор Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ L за протокола за витрификация на яйцеклетки  
или  
50  $\mu$ L за протокола за витрификация на ембриони

- Витрификационен разтвор Vitrification NX-VS (VS):  
50 µL за дадения протокол за витрификация
- Разтвор за промиване Washing NX-WS (WS):  
20 µL за протокола за витрификация на яйцеклетки.

#### ПРОТОКОЛ ЗА ВИТРИФИКАЦИЯ:

**ЗАБЕЛЕЖКА:** Процедурите трябва да се извършват при стайна температура (20 – 27° C). НЕ използвайте стойка на микроскоп с нагряване за следните процедури. **ВНИМАНИЕ:** По време на еквилибрирането в разтвори ES и VS сведете до минимум излагането на спесимена на светлина.

1. Затоплете количеството ES, VS и WS, което ще използвате, до стайна температура (20 – 27° C).  
**ЗАБЕЛЕЖКА:** Когато всеки път се налага да използвате само част от разтвора, избягвайте да затопляте многократно целите епруветки с ES, VS и WS до стайна температура. По-добре е да отделите количеството, което ще се използва, и да върнете епруветките на температура 2 – 8° C веднага след отделянето. Разтворът за промиване Washing NX (WS) се използва за витрификация на яйцеклетки.
2. Налейте течен азот в резервоара (LN<sub>2</sub>) – достатъчно за постигане на дълбочина от 4 инча или за пълно потапяне на криотубата или криопръчката, и го поставете близо до микроскопа. Прикрепете криотуба или бокал (незатоворен) към долната скоба на криопръчка и потопете в течния азот за подготовка за съхранение на витрифицираните спесимени.
3. Определете броя на спесимените, които ще бъдат витрифицирани.
4. Поставете етикет с необходимата информация на всяко стерилно петриево блюдо (или капак) и изделие за криосъхранение.
5. Преди да започнете процедурата, проверете внимателно изделието за витрификация.
6. Внимателно обърнете всяка епруветка с ES и VS, за да смесите съдържанието преди употреба.
7. Подгответе блюдото с капки разтвор за процедурата за витрификация, както следва:

#### **A. Протокол за витрификация на ЯЙЦЕКЛЕТКИ (MII):**

**ЗАБЕЛЕЖКА 1:** Извлечените яйцеклетки се оголват с хиалуронидаза, за да се потвърди, че са MII.

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

1. Капнете асептично 20 µL по една капка WS, ES1 и ES2 в непосредствена близост една от друга и ES3 върху обърнат капак на стерилно петриево блюдо, както е показано на Фигура 1, и поставете блюдото на стойката на микроскопа:
  - една капка 20 µL WS
  - три капки от по 20 µL (общо 60 µL) ES (ES1, ES2, ES3).
2. Извадете блюдото за култивиране, съдържащо яйцеклетки MII, от инкубатора и проверете качеството на спесимените под микроскоп. Когато е възможно, изберете само яйцеклетката/яйцеклетките в MII стадий с най-добро качество.  
**ВНИМАНИЕ:** По време на еквилибрирането в капки WS, ES и VS сведете до минимум излагането на спесимена/спесимените на светлина.
3. Прехвърлете яйцеклетките (до 2 наведнъж) с минимално количество от средата от блюдото за култивиране (в инкубатор) в капка 20 µL WS за една минута.
4. Смесете капката WS с ES1 (вж. Фигура 1, стрелка 1) с върха на трансфериращата пипета и изчакайте 2 минути, за да се позволи спонтанно смесване на двата разтвора.
5. След това смесете капката ES2 (стрелка 2) със смесените по-рано капки и изчакайте 2 минути.
6. Прехвърлете яйцеклетката/яйцеклетките с минимално количество разтвор от смесените капки в капка ES3 за 6 – 10 минути.  
**Забележка:** еквилибрирането на яйцеклетката/яйцеклетките в ES3 е завършено, когато дебелината на zona pellucida е равна на перивителиновото пространство. Яйцеклетката/яйцеклетките обикновено ще се утаи/утаят на дъното на капката в рамките на 3 минути.
7. По време на периода за еквилибриране в ES3 капнете асептично една (1) капка 50 µL VS преди завършването на еквилибрирането и подгответе избраното изделие за витрификация за зареждане (Фигура 2).
8. Следващите стъпки (9 – 13) трябва да бъдат завършени в рамките на 80 – 110 секунди.

**ВНИМАНИЕ:** Излагането на спесимените на VS трябва да бъде ограничено, за да се предотврати цитотоксичност. Спесиментъ/спесимените изплуват/изплуват във VS, така че настройте фокуса чрез микроскопа, за да поддържате непрекъснато визуализиране по време на излагането, и дръжте наблизо върха на трансфериращата пипета, за да осигурите бърз трансфер между капките. Вижте Фигура 2.

9. Изплакнете и напълнете върха на трансфериращата пипета с VS непосредствено преди приключването на еквилибрирането в ES и изтеглете спесимена/спесимените с минимално количество ES във върха на пипетата, след което прехвърлете в капката VS за 50 – 60 секунди. Оставете яйцеклетките на дъното на VS. Докато ги оставяте, яйцеклетките ще изплуват на повърхността на VS. За да гарантирате цялостното изплакване с VS, внимателно преместете яйцеклетките обратно до центъра на дъното на VS с помощта на пипетата.

По време на този процес яйцеклетките ще бъдат дехидратирани и отново ще изплуват.

10. Заредете и запечатайте изделието за витрификация съгласно указанията на производителя.
11. Поставете витрифицираните спесимени на избраното изделие за витрификация в потопената LN<sub>2</sub> пълната криотръба или бокала (върху криопръчката) по Фигура 3. Затворете криотръбата (или бокала) или я закрепете с върха надолу с друга незатоворена криотръба, за да фиксирате витрифицираното изделие в течния азот.
12. Преместете резервоара с LN<sub>2</sub> близо до криокамера с LN<sub>2</sub> и прехвърлете пълната криопръчка в криокамерата за дългосрочно съхранение.

## **Б. Протокол за витрификация на ЕМБРИОНИ (PN в бластоцист):**

1. Капнетте асептично една капка 50  $\mu\text{L}$  ES върху обърнат капак на петриево блюдо (Фигура 4).
2. Извадете блюдото за култивиране с ембрион/ембриони от инкубатора и проверете качеството на спесимена/спесимените под микроскоп. Когато е възможно, изберете само ембриона/ембрионите с най-добро качество за витрификация.
3. Внимателно прехвърлете спесимените с минимално количество от средата (до два наведнъж) от блюдото за култивиране в капката ES и включете таймера.

Ембрионите трябва да се уравновесят в капката ES бавно чрез свободно падане в продължение на 6 – 10 минути.

**ЗАБЕЛЕЖКА 1:** Спесиментът ще се свие и след това постепенно ще се върне към първоначалния си размер, което показва, че еквилибрирането е завършено.

**ВНИМАНИЕ:** По време на еквилибрирането в капки ES и VS сведете до минимум излагането на спесимена/спесимените на светлина.

4. По време на периода за еквилибриране в ES капнетте асептично една капка 50  $\mu\text{L}$  VS разтвор, както е показано на Фигура 4, и подгответе избраното изделие за витрификация за зареждане.
5. Изплакнете и напълнете върха на трансфериращата пипета с VS непосредствено преди приключването на еквилибрирането в ES и изтеглете спесимена/спесимените с минимално количество ES във върха на пипетата, след което прехвърлете в капката VS за най-малко 30 секунди. Оставете ембрионите на дъното на VS. Докато ги оставяте, ембрионите ще изплават на повърхността на VS. За да гарантирате цялостното изплаване с VS, внимателно преместете ембрионите обратно до центъра на дъното на VS с помощта на пипетата.

**ЗАБЕЛЕЖКА 2:** По време на този процес ембрионите ще бъдат дехидратирани и отново ще изплават.

6. Заредете и запечатайте изделието за витрификация съгласно указанията на производителя.
7. Поставете избраното витрифицирано изделие за витрификация в потопената LN<sub>2</sub>, пълната криотръба или бокала (върху криопръчката) по Фигура 3. Затворете криотръбата (или бокала) или я закрепете с върха надолу с друга незатворена криотръба, за да фиксирате витрифицираното изделие в течния азот.
8. Преместете резервоара с LN<sub>2</sub> близо до криокамера с LN<sub>2</sub> и прехвърлете пълната криопръчка в криокамерата за дългосрочно съхранение.

За допълнителни подробности относно употребата на тези продукти всяка лаборатория трябва да направи справка със собствените си лабораторни процедури и протоколи, които са конкретно разработени и оптимизирани за Вашата индивидуална медицинска програма.

## **ИНСТРУКЦИИ ЗА СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ**

Съхранявайте неотворените епруветки в хладилник при 2° C до 8° C. Когато се съхраняват според инструкциите, разтворите Vit Kit - Freeze NX са стабилни до изтичане на срока им на годност, посочен на етикетите на епруветките.

Не използвайте средата повече от четиринадесет (14) дни след отваряне на контейнерите.

Тъй като в продукта има налични материали от човешки източник, в него може да се развият някои частици по време на съхранение. Не е установено дали този тип частици влияе върху действието на продукта.

## **ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ**

Това изделие е предназначено за употреба от персонал, обучен в процедурите за асистирана репродукция. Тези процедури включват предвиденото приложение, за което това изделие е предназначено.

Учреждението на потребителя на това изделие носи отговорност за поддържане на проследяемостта на продукта и трябва да спазва националните разпоредби относно проследяемостта, когато е приложимо.

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

За да избегнете проблеми със замърсяване, използвайте асептични техники.

В момента научната литература посочва, че дългосрочните ефекти от витрификация на яйцеклетки и ембриони все още не са известни.

Не използвайте бутилки с нарушена стерилна опаковка.

ЕС: Стандартните мерки за предотвратяване на инфекции, произтичащи от употребата на лекарствени продукти, приготвени от човешка кръв или плазма, включват избор на донори, скрининг на индивидуално даряване и резервоари с плазма за специфични маркери за инфекция, както и включване на ефективни производствени стъпки за деактивиране/премахване на вируси. Въпреки това, когато се прилагат лекарствени продукти, приготвени от човешка кръв или плазма, не може напълно да се изключи възможността от предаване на причинители на инфекции. Това се отнася също и за неизвестни или нововъзникващи вируси и други патогени. Няма данни за доказано предаване на вируси с албумин, произведен по спецификациите на Европейската фармакопея и според установените процеси. Настоятелно се препоръчва при всяко прилагане на продуктите с репродуктивни средства FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. върху пациент да се записват наименованието и номера на партидата на продукта, за да се поддържа връзка между пациента и партидата.

САЩ; Този продукт съдържа човешки серумен албумин (HSA). Материалите от човешки източник, използвани при производството на този продукт, са изследвани с комплекти, лицензирани от Агенцията за контрол на храните и лекарствата, и не е установено да са реактивни на антителата срещу хепатит С (HCV) антителата срещу човешки имунодефицитен вирус (HIV). Въпреки това нито един метод на изследване не дава пълна гаранция, че продуктите от човешки източник не причиняват инфекции. Работете с всички материали от човешки източник като с материали, способни да предават инфекции, като използвате универсални предпазни мерки. Освен това донорите на изходните материали се изследват за болест на Кройцфелд-Якоб (CJD).

#### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ**

Продуктът съдържа гентамицин сулфат. Трябва да се вземат подходящи предпазни мерки, за да се гарантира, че пациентът не е чувствителен към антибиотици.

## HRVATSKI

**UPOZORENJE ZA EU:** Samo za profesionalnu uporabu.

### NAMJENA

Komplet Vit Kit – Freeze NX namijenjen je za primjenu u postupcima potpomognute oplodnje za vitifikaciju i čuvanje ljudskih oocita (MI) i zigota u pronuklearnom (PN) stadiju sve do embrija u 3. danu stadija diobe i embrija u stadiju blastociste.

### OPIS PROIZVODA

**Equilibration NX-ES** je otopina za ekvibraciju s dva pufera (HEPES i MOPS) medija Continuous Single Culture (CSCM) koja sadrži gentamicin sulfat, po 7,5 % (v/v) dimetil sulfoksida (DMSO) i etilen glikola te 20 % (v/v) Dextran Serum Supplementa (DSS).

**Vitrication NX-VS** je otopina za vitifikaciju s dva pufera (HEPES i MOPS) CSCM-a koja sadrži gentamicin sulfat, po 15 % (v/v) DMSO-a i etilen glikola te 20 % (v/v) DSS-a i 0,5 M trehaloze.

**Washing NX-WS** je otopina za ispiranje s dva pufera (HEPES i MOPS) CSCM-a koja sadrži gentamicin sulfat i 20 % DSS-a.

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

Ove se otopine moraju upotrebljavati sekvencijalno prema protokolu vitrificacije mikrokapima korak po korak.

### SASTAV

#### Soli i ioni

Kalijev fosfat  
Natrijev klorid  
Kalijev klorid  
Magnezijev sulfat  
Kalcijev klorid

#### Aminokiseline

L-arginin  
Glicin  
L-histidin  
L-lizin  
L-prolin  
L-tirozin  
L-alanin  
L-aspartatna kiselina  
L-asparagin  
L-glutamatna kiselina  
L-izoleucin  
L-leucin  
L-alanil-l-glutamin  
L-metionin

#### Lfenilalanin

L-serin  
L-treonin  
L-triptofan  
L-valin  
L-cistin

#### Energetski supstrati

Dekstroza  
Natrijev piruvat  
Natrijev laktat

#### Pufer

Natrijev bikarbonat  
HEPES  
MOPS

#### Antioksidansi

Natrijev citrat  
EDTA

#### Bjelančevina

Humani serumski albumin,  
HSA

#### Krioprotektivna sredstva

Dekstran  
Trehaloza  
Etilen-glikol  
Dimetilsulfoksid

### OSIGURANJE KVALITETE

Otopine u kompletu Vit Kit – Freeze NX membranski su filtrirane i aseptički obrađene prema provjerenim proizvodnim postupcima.

Svaka šarža kompleta Vit Kit – Freeze NX ispituje se sljedećim testovima:

- Endotoksin prema metodologiji Limulus amebocitnog lizata (LAL) ( $\leq 0,6$  EU/ml) za bakterijske endotoksine u skladu s Farmakopejom Sjedinjenih Američkih Država <85> i Ph. Eur. 2.6.14
- Analiza mišjeg embrija (jedna stanica) ( $\geq 80$  % proširena blastocista)
- Sterilnost primjenom važećeg testa sterilnosti u skladu s Farmakopejom Sjedinjenih Američkih Država, USP <71>, Ph. Eur. 3.2 (prolazan rezultat)

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

### POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU UKLJUČENI U OPSEG ISPORUKE

- Uređaj za vitifikaciju, po izboru
- Sterilne Petrijeve zdjelice (50 x 9 mm, Falcon 351006 ili proizvod jednake kvalitete)
- Krioepruvete (4,5 ml) ili čašice i aluminijski držači (*cryocanes*)
- Hijaluronidaza (kataloški br. 90101) za vitifikaciju oocita
- Rukavice za jednokratnu uporabu
- Prijenosne pipete (pipete od vučenog stakla ili vršci mikropipeta s unutarnjim promjerom vrška od ~200  $\mu$ m)
- Pinceta ili hvataljka
- Štoperica ili brojač vremena
- Spremnik za tekući dušik (vakuumska boca ili spremnik od stiropora s poklopcem, volumen 1 – 2 l)
- Tekući dušik (dovoljan volumen da dubina u spremniku bude 4 inča)

### UPUTE ZA UPORABU

Zahjebi za komponente kompleta Vit Kit – Freeze NX (za svaku primjenu):

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ l za protokol vitrificacije za oocite  
ili  
50  $\mu$ l za protokol vitrificacije za embrije

- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl za svaki protokol vitrifikacije
- Washing NX-WS (WS):  
20 µl za protokol vitrifikacije za oocite

#### PROTOKOL VITRIFIKACIJE:

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

1. Zagrijte na sobnu temperaturu (20 – 27 °C) potrebnu količinu otopina ES, VS i WS.  
NAPOMENA: Ne zagrijavajte cijele ampule otopina ES, VS i WS na sobnu temperaturu ako svaki put trebate samo dio otopine. Bolje je odrediti alikvotne za količinu koju ćete upotrijebiti i odmah nakon toga vratiti ampule na 2 – 8 °C. Otopina Washing NX (WS) upotrebljava se za vitrifikaciju oocita.
2. Spremnik za tekući dušik napunite tekućim dušikom (LN<sub>2</sub>) – dovoljno za postizanje dubine od 4 inča ili da krioprugeta na držaču bude potpuno uronjena – i postavite ga blizu mikroskopa. Pričvrstite krioprugetu ili čašicu (bez čepa) na donju stezaljku aluminijskog držača i uronite je u tekući dušik da biste je pripremili za čuvanje vitrificiranih uzoraka.
3. Odredite broj uzoraka koje ćete vitrificirati.
4. Zabilježite potrebne podatke na svaku sterilnu Petrijevu zdjelicu (ili poklopac) i uređaj za kriogenu pohranu.
5. Prije postupka pomno provjerite uređaj za vitrifikaciju.
6. Prije upotrebe nježno preokrenite svaku ampulu otopine ES i VS da biste promiješali sadržaj.
7. Pripremite zdjelicu s kapljicama otopina za vitrifikaciju kako slijedi:

#### A. Protokol vitrifikacije za OOCITE (MII):

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

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

1. Aseptički dodajte kap od 20 µl otopine WS, ES1 i ES2 u međusobnoj neposrednoj blizini, te otopine ES3 na preokrenuti poklopac sterilne Petrijeve zdjelice kako je prikazano na slici 1. i položite zdjelicu na stolić mikroskopa:
  - jednu kap otopine WS od 20 µl
  - tri kapi otopine ES od 20 µl (ukupno 60 µl) (ES1, ES2, ES3)
2. Izvadite iz inkubatora zdjelicu za kultivaciju s oocitima u metafazi II i provjerite količinu uzoraka pod mikroskopom. Ako je moguće, odaberite oocit(e) u metafazi II samo najbolje kvalitete.  
OPREZ: Što manje izlažite uzorak (uzorke) svjetlosti tijekom ekvibracije u kapljicama WS, ES i VS.
3. Prenesite oocit (do 2 odjednom) s minimalnim volumenom medija iz zdjelice za kultivaciju (u inkubatoru) u kap WS od 20 µl na jednu minutu.
4. Spojite kap WS s otopinom ES1 (pogledajte sliku 1., strelica 1.) vrškom prijenosne pipete i pustite da se spontano miješanje dviju otopina odvija 2 minute.
5. Zatim spojite kap otopine ES2 (strelica 2.) s prethodno spojenim kapima i ostavite 2 minute.
6. Prenesite oocit(e) s minimalnim volumenom otopine iz spojene kapi u kap otopine ES3 na 6 – 10 minuta.  
Napomena: ekvibracija oocita u ES3 gotova je kad se ujednači debljina *zone pellucide* i prostora perivitelina. Oocit(i) će se obično spustiti na dno kapi unutar 3 minute.
7. Tijekom ekvibracije u ES3 aseptički dodajte jednu (1) kap otopine VS od 50 µl prije završetka ekvibracije i pripremite odabrani uređaj za vitrifikaciju za punjenje (slika 2).
8. Sljedeće korake (9 – 13) valja završiti unutar 80 – 110 sekundi.
- OPREZ: Ograničite izlaganje uzoraka otopini VS da ne bi došlo do citotoksičnosti. Budući da uzorak (uzorci) obično plutaju u otopini VS, prilagodite fokus kroz mikroskop da biste zadržali stalnu vidljivost tijekom izlaganja i držite vršak prijenosne pipete u blizini kako biste osigurali brz prijenos između kapi. Pogledajte sliku 2.
9. Isperite i napunite vršak prijenosne pipete otopinom VS neposredno prije završetka ekvibracije u otopini ES, potom usišite uzorak (uzorke) s minimalnim volumenom otopine ES u vršak pipete i prenesite u kap otopine VS na 50 – 60 sekundi. Ispustite oocite na dno kapi VS. Tijekom ispuštanja oociti će otplutati na vrh kapi VS. Pipetiranjem nježno pomaknite oocite natrag do dna središta kapi VS kako biste osigurali temeljito ispiranje u otopini VS.  
Tijekom ovog postupka oociti će dehidrirati i ponovo će početi plutati.
10. Napunite i zavrtnete uređaj za vitrifikaciju prema uputama proizvođača.
11. Stavite vitrificirani uzorak (uzorke) u odabrani uređaj za vitrifikaciju u uronjenu krioprugetu ili čašicu (na aluminijskom držaču) ispunjenu tekućim dušikom LN<sub>2</sub> – slika 3. Stavite čep na krioprugetu (ili čašicu) ili je pričvrstite preokrenutu s još jednom nezačepljenom krioprugetom da biste osigurali vitrificirani uređaj u tekućem dušiku.
12. Primaknite spremnik tekućeg dušika (LN<sub>2</sub>) kriozamrzivaču s LN<sub>2</sub> i prenesite aluminijski držač sa sadržajem u kriozamrzivač na dugoročnu pohranu.

#### B. Protokol vitrifikacije za EMBRIJE (od pronuklearnog stadija do stadija blastociste):

1. Aseptički dodajte jednu kap otopine ES od 50 µl na preokrenuti poklopac Petrijeve zdjelice (slika 4).
2. Izvadite iz inkubatora zdjelicu za kultivaciju s embrijem (embrijima) i provjerite količinu uzor(a)ka pod mikroskopom. Ako je moguće, za vitrifikaciju odaberite samo embrio (embrije) najbolje kvalitete.
3. Pažljivo prenesite uzorak (do dva odjednom) s minimalnim volumenom medija iz zdjelice za kultivaciju u kap otopine ES i pokrenite brojač vremena.  
Embriji bi se trebali polako slobodnim padom ekvibrirati u kap otopine ES 6 – 10 minuta.  
NAPOMENA 1: Uzorak će se smanjiti i zatim postupno vratiti u prvotnu veličinu, što znači da je ekvibracija gotova.  
OPREZ: Što manje izlažite uzorak (uzorke) svjetlosti tijekom ekvibracije u kapljicama otopina ES i VS.



4. Tijekom ekvilibracije u ES aseptički dodajte jednu kap otopine VS od 50  $\mu$ l kako je prikazano na slici 4. i pripremite odabrani uređaj za vitrifikaciju za punjenje.
5. Isperite i napunite vršak prijenosne pipete otopinom VS neposredno prije završetka ekvilibracije u otopini ES, potom usišite uzorak (uzorke) s minimalnim volumenom otopine ES u vršak pipete i prenesite u kap otopine VS na najmanje 30 sekundi. Ispustite embrije na dno kapi VS. Tijekom ispuštanja embriji će otplutati na vrh kapi VS. Pipetiranjem nježno pomaknite embrije natrag do dna središta kapi VS kako biste osigurali temeljito ispiranje u otopini VS.  
NAPOMENA 2: Tijekom ovog postupka embriji će dehidrirati i ponovo će početi plutati.
6. Napunite i zabrtvite uređaj za vitrifikaciju prema uputama proizvođača.
7. Stavite odabrani vitrificirani uređaj za vitrifikaciju u uronjenu kriopruvetu ili čašicu (na aluminijskom držaču) ispunjenu tekućim dušikom ( $LN_2$ ) – slika 3. Stavite čep na kriopruvetu (ili čašicu) ili je pričvrstite preokrenutu s još jednom nezačepljenom kriopruvetom da biste osigurali vitrificirani uređaj u tekućem dušiku.
8. Primaknite spremnik tekućeg dušika ( $LN_2$ ) kriozamrzivač s  $LN_2$  i prenesite aluminijski držač sa sadržajem u kriozamrzivač na dugoročnu pohranu.

Dodatne pojedinosti o upotrebi ovih proizvoda svaki laboratorij treba potražiti u svojim laboratorijskim postupcima i protokolima koji su posebno razvijeni i optimirani za medicinski program upravo tog laboratorija.

#### **UPUTE O SKLADIŠTENJU I STABILNOST**

Neotvorene ampule skladištite u hladnjaku na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Kada se otopine iz kompleta Vit Kit – Freeze NX skladište prema uputama, stabilne su do roka valjanosti navedenog na naljepnicama ampula.

Ne upotrebljavajte medije dulje od četrnaest (14) dana nakon otvaranja spremnika.

Budući da proizvod sadrži materijal ljudskog podrijetla, u njemu mogu nastati čestice tijekom skladištenja. Nije poznato da ta vrsta čestica ikako utječe na funkciju proizvoda.

#### **MJERE OPREZA I UPOZORENJA**

Ovaj je proizvod namijenjen samo osoblju koje je obučeno za postupke potpomognute oplodnje. Ti postupci uključuju primjenu za koju je namijenjen ovaj proizvod.

Ustanova u kojoj se upotrebljava ovaj proizvod odgovorna je za osiguravanje sljedivosti proizvoda i mora postupati u skladu s nacionalnim propisima o sljedivosti, kada je to primjenjivo.

Ne upotrebljavajte nijednu ampulu s otopinom koja pokazuje znakove oštećenja, curenja, čestica ili zamagljenja. Odložite proizvod u otpad prema mjerodavnim propisima.

Da biste izbjegli probleme s kontaminacijom, rukujte s pomoću aseptičkih tehnika.

U najnovijoj istraživačkoj literaturi navedeno je da su i dalje nepoznati dugoročni učinci vitrifikacije na oocite i embrije.

Ne upotrebljavajte nijednu bočicu čijem je pakiranju narušena sterilnost.

EU: Standardne mjere za sprečavanje infekcija koje su uzrokovane upotrebom medicinskih proizvoda pripremljenih od ljudske krvi ili plazme uključuju odabir davatelja, probir pojedinih davanja i sjedinjenja plazme za specifične markere infekcije te primjenu učinkovitih proizvodnih koraka za inaktivaciju/uklanjanje virusa. Unatoč tome, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost prijenosa infektivnih agensa kada se primjenjuju lijekovi proizvedeni iz ljudske krvi ili plazme. To se odnosi i na nepoznate ili novonastale viruse i druge patogene. Nisu prijavljeni dokazani prijenosi virusa albuminom koji je proizveden utvrđenim postupcima prema specifikacijama Europske farmakopeje. Izričito se preporučuje da se bilježi naziv i broj serije proizvoda svaki put kada se u pacijenata primjenjuju mediji za kulturu iz asortimana proizvoda za potpomognutu oplodnju društva FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. kako bi se uspostavila poveznica između pacijenta i serije proizvoda.

SAD: Ovaj proizvod sadrži Human Serum Albumin (HSA). Materijal ljudskog podrijetla koji je upotrijebljen za proizvodnju ovog proizvoda testiran je kompletima koje je licencirala američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) i utvrđeno je da nije reaktivan na protutijela na hepatitis C (HCV) ni protutijela na virus humane imunodeficijencije (HIV). Međutim, nijednom ispitnom metodom nije moguće potpuno potvrditi da proizvodi ljudskog podrijetla nisu zarazni. Svim materijalima ljudskog podrijetla mora se rukovati kao da mogu prenijeti zarazu, primjenjujući univerzalne mjere opreza. Davatelji izvornog materijala testirani su na CJB.

#### **KONTRAINDIKACIJA**

Proizvod sadrži gentamicin sulfat. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza da biste osigurali da pacijent nije osjetljiv na ovaj antibiotik.



## MALTI

**TIWISSIJA GHALL-UE:** Ghall-Użu Professjonali Biss.

### UŻU INTENZJONAT

Vit Kit - Freeze NX huwa maħsub għall-użu fil-proċeduri ta' riproduzzjoni assistita għall-vitifikazzjoni u l-ħażna ta' oociti umani (MII), žigoti pronukleari (PN) permezz ta' embrijuni fl-istadju tal-qsim tat-3 jum u embrijuni fl-istadju tal-blastocist.

### DESKRIZZJONI TAL-APPARAT

**Equilibration NX-ES** hija soluzzjoni b'żewġ bafers (HEPES u MOPS) ta' Continuous Single Culture medium (CSCM) li fiha Gentamicin Sulfate, 7.5% (v/v) ta' kull DMSO u ethylene glycol, u 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS).

**Vitrification NX-VS** hija soluzzjoni b'żewġ bafers (HEPES u MOPS) ta' CSCM li fiha Gentamicin Sulfate, 15% (v/v) ta' kull DMSO u ethylene glycol, 20% (v/v) DSS u 0.5 M Trehalose.

**Washing NX-WS** hija soluzzjoni b'żewġ bafers (HEPES u MOPS) ta' CSCM li fiha Gentamicin Sulfate u 20% DSS.

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

Dawn is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw f'sekwenza skont il-protokoll tat-tahlil gradwali tal-microdrop (vitifikazzjoni progressiva ta' qtar ta' daqs mikro).

### KOMPOŻIZZJONI

#### Mluħa u Joni

Potassium Phosphate  
Sodium Chloride  
Potassium Chloride  
Magnesium Sulfate  
Calcium Chloride

#### Āċidi Amminiċi

L-Arginine  
Glycine  
L-Histidine  
L-Lysine  
L-Proline  
L-Tyrosine  
L-Alanine  
L-Aspartic Acid  
L-Asparagine  
L-Glutamic Acid  
L-Isoleucine  
L-Leucine  
L-Alanyl-L-Glutamine  
L-Methionine

L-Phenylalanine  
L-Serine  
L-Threonine  
L-Tryptophan  
L-Valine  
L-Cystine

#### Substrati tal-Energija

Dextrose  
Sodium Pyruvate  
Sodium Lactate

#### Buffer

Sodium Bicarbonate  
HEPES  
MOPS

#### Antiossidanti

Sodium Citrate  
EDTA

#### Proteini

Albumina tas-Serum Uman,  
HSA

#### Krijjoprotetturi

Dextran  
Trehalose  
Ethylene Glycol  
Dimethylsulfoxide

### ASSIGURAZZJONI TAL-KWALITÀ

Is-soluzzjonijiet ta' Vit Kit - Freeze NX huma mgħoddija minn filtru ta' membrana u pprocessati b'mod asettiku b'konformità mal-proċeduri tal-manifattura li ġew ivaldati.

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

- Endotossina bil-metodoloġija Limulus Amebocyte Lysate (LAL) ( $\leq 0.6$  EU/mL) minn Endotossini Batteriċi USP <85> u Ph. Eur. 02/06/2014
- Mouse Embryo Assay (b'ċellola waħda) ( $\geq 80\%$  tal-blastocist estżi)
- Sterilità permezz tat-Test ta' Sterilità attwali tal-USP <71>, Ph. Eur. 3.2 (Riżultat Pożittiv)

Ir-riżultati kollha huma rrapportati fuq Ċertifikat ta' Analizi speċifiku għal-lott li huwa disponibbli meta mitlub.

### MATERJALI MEHTIEĠA IŻDA MHUX INKLUŻI

- It-tagħmir tal-għażla għall-vitifikazzjoni
- Dixxijiet ta' petri sterili (50 X 9 mm, Falcon 351006 jew ekwivalenti)
- Tubi krijjoġeniċi (4.5 mL) jew goblets u cryocanes
- Hyaluronidase (Katalgu #90101) għall-vitifikazzjoni tal-oociti
- Ingwanti li jintremew wara l-użu
- Pipetti għat-trasferiment (pipetti tal-ħġieg imiġbud jew ponot tal-mikropipetti b'dijametru intern tal-ponta ta' ~200  $\mu$ m)
- Pinzetti jew tnaljetti
- Kronometru jew tagħmir li jżomm il-ħin
- Kontenitur għan-nitroġenu likwidu (kontenitur dewar jew tal-istryfoam bl-għatu, volum ta' 1-2 L)
- Nitroġenu likwidu (volum biżżejjed biex jilħaq fond ta' 4 pulzieri fil-kontenitur)

### ISTRUZZJONIJIET DWAR L-UŻU

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

- Equilibration NX-ES (ES):  
60  $\mu$ L għall-Protokoll tal-Vitifikazzjoni tal-Oociti  
Jew  
50  $\mu$ L għall-Protokoll tal-Vitifikazzjoni tal-Embrijuni

- Vitrification NX-VS (VS):  
50 µL għal kwalunkwe Protokoll tal-Vitrifikazzjoni
- Washing NX-WS (WS):  
20 µL għall-Protokoll tal-Vitrifikazzjoni tal-Ooċiti

### PROTOKOLL TAL-VITRIFIKAZZJONI:

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

1. Gib il-kwantità ta' ES, VS, u WS li għandhom jintużaw għal temperatura ambjentali (20-27°C).  
NOTA: Evita li tġib il-kunjetti kollha ta' ES, VS u WS għal temperatura ambjentali ripetutament meta tkun meħtieġa parti parzjali tas-soluzzjoni kull darba. Ikun aħjar li tagħmel il-kwantità li għandha tintuża falikwoti u tirritorna l-kunjetti għal temperatura ta' 2-8°C minnufih wara jsiru l-alikwoti. Washing NX (WS) jintuża għall-vitrifikazzjoni tal-ooċiti.
2. Imla l-kontenitur tan-nitroġenu likwidu bin-nitroġenu likwidu (LN<sub>2</sub>) – biżżejjed biex tilhaq fond ta' 4 pulzieri jew biex tgħaddas kompletament it-tubu krijoġeniku fuq il-bastun – u poggih vicin il-mikroskopju. Waħhal tubu krijoġeniku jew goblet (mingħajr tapp) mal-morsa tal-qiegħ ta' cryocane u għaddas fin-nitroġenu likwidu bi preparazzjoni għall-ħażna tal-kampjuni vvitrifikati.
3. Stabbilixxi n-numru ta' kampjuni li għandhom jiġu vvitrifikati.
4. Waħhal tikketta bl-informazzjoni meħtieġa ma' kull Petri dixx (jew għatu) sterili u tagħmir tal-ħażna Cryo.
5. Eżamina t-tagħmir tal-vitrifikazzjoni bir-reqqa qabel tibda l-proċedura.
6. Bil-mod aqleb kull kunjett ta' ES u VS rasu 'l isfel biex thawwad il-kontenut qabel l-użu.
7. Ipprepara d-dixx bil-qtar tas-soluzzjonijiet għall-Proċedura tal-Vitrifikazzjoni kif ġej:

#### A. Protokoll tal-Vitrifikazzjoni tal-OOĊITI (MII):

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

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

1. Iddistribwixxi b'teknika asettika qatra ta' 20 µL ta' WS, ES1 u ES2 mill-qrib hafna u ES3 fuq għatu bil-maqlub ta' dixx petri sterili kif muri fil-Figura 1, u poggji d-dixx fuq il-baži tal-mikroskopju:
  - qatra waħda ta' 20 µL ta' WS
  - tliet qatriet ta' 20 µL (total ta' 60 µL) ta' ES (ES1, ES2, ES3)
2. Neħhi d-dixx tat-tkabbir tal-kultura li fin l-ooċiti MII mill-inkubatur u ċekkja l-kwalità tal-kampjuni bil-mikroskopju. Fejn possibbli, għażel biss l-ooċiti tal-istadju MII tal-aħjar kwalità.  
ATTENZJONI: Imminimizza l-esponiment tal-kampjun(i) għad-dawl waqt l-ekwilibrizzjoni fil-qatriet ta' WS, ES u VS.
3. Ittrasferixxi l-ooċita (sa 2 kull darba) b'volum minimu ta' midjum mid-dixx tat-tkabbir tal-kultura (fl-inkubatur) fil-qatra ta' 20 µL ta' WS għal minuta.
4. Għaqqad il-qatra ta' WS ma' ES1 (Ara Figura 1, vleggja 1) bil-ponta tal-pipetta tat-trasferiment u stenna li jseħh it-tahlit spontanju taż-żewġ soluzzjonijiet għal 2 minuti.
5. Imbagħad għaqqad il-qatra ta' ES2 (vleggja 2) mal-qtar magħquda qabel u halliħom għal 2 minuti.
6. Ittrasferixxi l-ooċiti b'volum minimu tas-soluzzjoni mill-qatra magħquda ma' qatra ta' ES3 għal 6-10 minuti.

Nota: l-ekwilibrizzjoni tal-ooċiti f'ES3 hija kompluta meta l-ħxna taż-żona pellucida tkun daqs l-ispażju tal-perivitelline. Tipikament l-ooċiti jinżlu fil-qiegħ tal-qatra fi żmien 3 minuti.

7. Matul il-perjodu tal-ekwilibrizzjoni f'ES3, iddistribwixxi b'teknika asettika qatra waħda (1) ta' 50 µL ta' VS qabel l-ekwilibrizzjoni kompluta u pprepara t-tagħmir tal-għażla tal-Vitrifikazzjoni għat-tagħbija (Figura 2).
8. Il-fażijiet (9-13) li ġejjin għandhom jitlestew fi żmien 80-110 sekondi.  
ATTENZJONI: L-espożizzjoni tal-kampjuni għall-VS għandu jkun limitat biex tipprevjeni ċ-ċitotossicità. Il-kampjun(i) normalment jitla' (jitilgħu) fil-wiċċ tal-VS, għalhekk aġġusta l-iffokar permezz tal-mikroskopju biex iżżomm viżwalizzazzjoni kontinwa matul l-esponiment u żomm it-tarf tal-pipetta tat-trasferiment vicin biex tigarantixxi t-trasferiment rapidu bejn il-qatriet. Irreferi għal Figura 2.
9. Laħlah it-tarf tal-pipetta tat-trasferiment b'VS immedjatament qabel tkun lesta l-ekwilibrizzjoni fil-ES, iġbed il-kampjun(i) b'volum minimu ta' ES fit-tarf tal-pipetta u ttrasferih fil-qatra ta' VS għal 50-60 sekonda. Mott l-ooċiti fil-qiegħ tal-VS. Waqt li jkunu qed jinħattu, l-ooċiti jitilgħu fil-wiċċ tal-VS. Biex tiżgura tlahih shih b'VS, bil-mod mexxi l-ooċiti lura lejn in-nofs ta' qiegħ il-VS billi tuża l-pipetta.  
Matul dan il-proċess, l-ooċiti jkunu deidratati u jergħu jitilgħu lejn il-wiċċ.
10. Għabbi t-tagħmir tal-Vitrifikazzjoni u ssiġillah skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur.
11. Poggji l-kampjun/i vvitrifikat/ fuq it-tagħmir tal-għażla għall-Vitrifikazzjoni fit-tubu krijoġeniku jew goblet mgħaddsa kompletament fil-LN<sub>2</sub> (fuq il-cryocane) - Figura 3. Aghmel tapp mat-tubu krijoġeniku (jew goblet) jew waħlu rasu 'l isfel ma' tubu krijoġeniku iehor mingħajr tapp sabiex iżżomm it-tagħmir vvitrifikat fin-nitroġenu likwidu.
12. Ressaq il-kontenitur tal-LN<sub>2</sub> vicin il-frizza krijoġenika tal-LN<sub>2</sub> u trasferi l-cryocane bil-kontenut għall-frizza krijoġenika għall-ħażna fit-tul.

#### B. EMBRIJUNI (PN għal Blastocist) Protokoll tal-Vitrifikazzjoni:

1. Iddispensa b'teknika asettika qatra waħda ta' 50 µL ta' ES fuq għatu bil-maqlub ta' dixx petri (Figura 4).
2. Neħhi d-dixx tat-tkabbir bl-embrijuni mill-inkubatur u ċekkja l-kwalità tal-kampjun(i) bil-mikroskopju. Fejn hu possibbli, aghżel biss l-embrijun(i) tal-aħjar kwalità għall-vitrifikazzjoni.

3. I-trasferixxi l-kampjuni bl-attenzjoni (sa tnejn kull darba) b'volum minimu ta' midjum mid-dixx tal-koltura għall-qatra ta' ES u ixgħel il-kronometru.

L-embrijuni għandhom jekwilibrav fil-qatra ta' ES bil-mod b'mod liberu għal 6-10 minuti.

NOTA 1: Il-kampjuni l-ewwel jinxtorbu u mbagħad gradwalment jerġghu lura għall-qies originali tagħhom, u b'hekk jindikaw li l-ekwilibrazzjoni lesta.

ATTENZJONI: Imminimizza l-espożizzjoni tal-kampjun(i) għad-dawl waqt l-ekwilibrazzjoni fil-qtra ES u VS.

4. Matul dan il-perjodu tal-ekwilibrazzjoni f'ES, iddistribwixxi b'teknika asettika qatra waħda ta' 50 µL ta' soluzzjoni VS kif muri fil-Figura 4 u pprepara t-tagħmir tal-għażla tal-vitrifikazzjoni għat-tagħbija.
5. Lahlah it-tarf tal-pipetta tat-trasferiment b'VS immedjatament qabel tkun lesta l-ekwilibrazzjoni fl-ES, iġbed il-kampjun(i) b'volum minimu ta' ES fit-tarf tal-pipetta u ttrasferih fil-qatra ta' VS għal minimu ta' 30 sekonda. F'ott l-embrijuni fil-qiegħ tal-VS. Waqt li jkun qoq jinhattu, l-embrijuni jitlejgħu fil-wiċċ tal-VS. Biex tiżgura tlaħliħ sliħ b'VS, bil-mod mexxi l-embrijuni lura lejn in-nofs ta' qiegħ il-VS billi tuża l-pipetta.  
NOTA 2: Matul dan il-proċess, l-embrijuni jkunu deirtrati u jerġghu jitlejgħu lejn il-wiċċ.
6. Għabbi t-tagħmir tal-Vitrifikazzjoni u ssiġillah skont l-Istruzzjonijiet tal-manifattur.
7. Poġġi t-tagħmir tal-għażla għall-Vitrifikazzjoni vvittrifikat fit-tubu krijoġeniku jew goblet mġhadssa kompletament fil-LN<sub>2</sub> (fuq il-cryocane) Figura 3. Aghmel tapp mat-tubu krijoġeniku (jew goblet) jew waħlu rasu 'l isfel ma' tubu krijoġeniku iehor mingħajr tapp sabiex iżzomm it-tagħmir ivvitrifikat fin-nitroġenu likwidu.
8. Ressaq il-kontenitur tal-LN<sub>2</sub> vicin il-frīza krijoġenika tal-LN<sub>2</sub> u ttrasferi l-cryocane bil-kontenut għall-frīza krijoġenika għall-ħażna fit-tul.

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

### **ISTRUZZJONIJIET GĦALL-ĦAŻNA U L-ISTABILITÀ**

Aħżen il-kunjetti li għadhom ma nfeθx fil-frīġ f'temperatura ta' 2°C sa 8°C. Meta jinħażnu skont l-Istruzzjonijiet, is-Soluzzjonijiet tal-Vit Kit – Freeze NX jibqgħu stabbli sad-data tal-iskadenza murija fuq it-tikketti tal-kunjetti.

Tużax il-midja għal aktar minn erbatax-il jum (14) minn meta jinfetħu l-kontenituri.

Peress li l-prodott fih materjal minn sors uman jista' jżviluppa xi materja partikolata matul il-ħażna. Dan it-tip ta' materja partikolata mhux magħruf li għandu effett fuq il-prestazzjoni tal-prodott.

### **PREKAWZJONIJIET U TWISSIJIET**

Dan l-apparat huwa maħsub għall-użu minn persunal imħarġ f'proċeduri ta' riproduzzjoni assistita. Dawn il-proċeduri jinkludu l-applikazzjoni indikata li għaliha huwa maħsub dan l-apparat.

Il-faċilità li tagħmel użu minn dan l-apparat hija responsabbli biex iżzomm it-traċċabbiltà tal-prodott u għandha tikkonforma mar-regolamenti nazzjonali li jikkonċernaw it-traċċabbiltà, fejn hu applikabbli.

Tużax xi kunjett tas-soluzzjoni li juri evidenza ta' ħsara, tniħxija, partiċelli, jew soluzzjoni mdardra. Armi l-prodott skont ir-regolamenti applikabbli.

Sabiex jiġu evitati problemi ta' kontaminazzjoni, għandhom jintużaw teknici asettiċi.

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

Tużax fiixkun jekk l-ippakkjar sterili tiegħu jkollu l-ħsara.

UE: Miżuri standard biex jiġu evitati l-infezzjonijiet li jirriżultaw mill-użu ta' prodotti mediċinali ppreparati minn demm jew plażma umana jinkludu l-għażla tad-donaturi, l-iskrining ta' donazzjonijiet individwali u ta' lottijiet ta' plażma għal markaturi speċifiċi tal-infezzjonijiet, u l-inkluzjoni ta' miżuri effettivi fil-proċess tal-manifattura għall-inattivazzjoni/tneħhija tal-viruses. Minkejja dan, meta jingħataw prodotti mediċinali ppreparati minn demm jew plażma umana, il-possibiltà li organiżmi infettivi jiġu trażmessi ma tistax tiġi eskluża għal kollox. Dan japplika wkoll għal viruses u patoġeni oħra mhux magħrufa jew emerġenti. M'hemm l-ebda rapporti evidenzjati ta' trażmissjonijiet virali bl-albumina li kienet immanifatturata skont speċifikazzjonijiet tal-Farmakopea Ewropea minn proċessi stabbli. Hu rakkomandat bil-qawwa li kull darba li l-midjum għall-koltura ta' FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. Reproductive Media Products jingħata lil-pazjent, l-isem u n-numru tal-lott tal-prodott għandhom jiġu rreġistrati sabiex tinzamm rabta bejn il-pazjent u l-lott tal-prodott.

L-Istati Uniti: Dan il-prodott fih Albumina ta' Serum Uman (HSA). Il-materjal ta' sors uman użat fil-manifattura ta' dan il-prodott ġie ttestjat minn kits liċenzjati mill-FDA u ntvera li mhumiex reattivi għall-antikorpi tal-Epatite C (HCV), u għall-antikorpi tal-Virus tal-Immunodeficienza Umana (HIV). Madankollu, l-ebda melodu tal-ittestjar ma joffri assigurazzjoni sliħa li l-prodotti miksuba minn sorsi umani mhumiex infettivi. Itratta kull materjal li ġej minn sors uman daqs li kieku jkun kapaċi jitrażmetti l-infezzjoni, billi tuża prekawzjonijiet universali. Id-donaturi tal-materjal sors ġew iskrinjati ukoll għall-marda CJD.

### **KONTRAIKIDAZZJONI**

Il-prodott fih Gentamicin Sulfate. Għandhom jittieħdu prekawzjonijiet adegwati biex ikun żgurat li l-pazjent mhux sensitizzat għal dan l-antibjotiku.

## SLOVENŠČINA

**OPOZORILO ZA EU:** Samo za profesionalno uporabo.

### PREDVIDENA UPORABA

Vit Kit – Freeze NX je namenjen za uporabo v postopkih asistiranе reprodukcije za vitifikacijo in shranjevanje človeških oocitov (MI), (PN) zigot v pronuklearnem stanju prek zarodkov 3. dne cepitve in zarodkov v fazi blastociste.

### OPIS PRIPOMOČKA

**Equilibration NX-ES** je dvojno pufrana raztopina (HEPES & MOPS) medija za kontinuirano posamezno kulturo (CSCM), ki vsebuje gentamicinijev sulfat, po 7,5 % (vol. %) DMSO in etilen glikola ter 20 % (vol. %) dopolnila seruma z dekstranom (DSS).

**Vitrication NX-WS** je dvojno pufrana raztopina (HEPES & MOPS) medija CSCM, ki vsebuje gentamicinijev sulfat, po 15 % (vol. %) DMSO in etilen glikola, 20 % (vol. %) DSS ter 0,5 M trehaloze.

**Washing NX-WS** je dvojno pufrana raztopina (HEPES & MOPS) medija CSCM, ki vsebuje gentamicinijev sulfat in 20 % DSS.

DSS je beljakovinski dodatek, ki je sestavljen iz 50 mg/ml humanega serumskega albumina (HSA) terapevtske kakovosti in 20 mg/ml dekstrana. DSS se uporablja pri koncentraciji 20 % (vol. %) v kompletu Vit Kit – Freeze NX za ustvarjanje končne koncentracije 10 mg/ml HSA in 4 mg/ml dekstrana.

Te raztopine se uporabljajo zaporedno skladno s protokolom postopne mikropaplične vitifikacije.

### SESTAVA

#### Soli in ioni

Kalijev fosfat  
Natrijev klorid  
Kalijev klorid  
Magnezijev sulfat  
Kalcijev klorid

#### Aminokisljine

L-arginin  
Glicin  
L-histidin  
L-lizin  
L-prolin  
L-tirozin  
L-alanin  
L-asparaginska kislina  
L-asparagin  
L-glutaminska kislina  
L-izolevcin  
L-levcin  
L-alanil-L-glutamin  
L-metionin

L-fenilalanin  
L-serin  
L-treonin  
L-triptofan  
L-valin  
L-cistin

#### Energijski substrati

Dekstroza  
Natrijev piruvat  
Natrijev laktat

#### Pufer

Natrijev bikarbonat  
HEPES  
MOPS

#### Antioksidanti

Natrijev citrat  
EDTA

#### Beljakovine

Humani serumski albumin,  
HSA

#### Krioprotektanti

Dekstran  
Trehaloza  
Etilenglikol  
Dimetil sulfoksid

### ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

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

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

- prisotnosti endotoksinov z reagentom LAL (Limulus Amebocyte Lysate) ( $\leq 0,6$  EU/ml) po Farmakopeji ZDA za bakterijske endotoksine <85> in Evropski farmakopeji 2.6.14
- preizkus z mišjimi embriji (ena celica) ( $\geq 80$  % razširjena blastocista),
- sterilnosti s trenutnim testom Farmakopeje ZDA za sterilnost <71>, Evropske farmakopeje 3.2 (opravljeno)

Vsi rezultati so navedeni na analiznem certifikatu za vsako serijo, ki je na voljo na zahtevo.

### POTREBNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Pripomoček za vitifikacijo po izbiri
- Sterilne petrijevke (50 X 9 mm, Falcon 351006 ali enakovredno)
- Kriopruvete (4,5 ml) ali čaše in kriopalčke
- Hialuronidaza (kataloška št. 90101) za vitifikacijo oocitov
- Rokavice za enkratno uporabo
- Prenosne pipete (izvlečene steklene pipete ali konice mikropipet z notranjim premerom konice ~200  $\mu$ m)
- Pincete ali kleščice
- Štoparica ali časovnik
- Rezervoar tekočega dušika (Dewarjeva posoda ali stiroporni vsebnik s pokrovom, prostornina 1–2 l)
- Tekoči dušik (zadostna prostornina za doseganje 4 palcev globine v rezervoarju)

### NAVODILA ZA UPORABO

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

- Raztopina Equilibration NX-ES (ES):
  - 60  $\mu$ l za protokol vitifikacije oocitov
  - ali
  - 50  $\mu$ l za protokol vitifikacije embrija

- Raztopina Vitrification NX-VS (VS):  
50 µl za kateri koli protokol vitifikacije
- Raztopina Washing NX-WS (WS):  
20 µl za protokol vitifikacije oocitov

#### PROTOKOL VITRIKACIJE:

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

1. Količina raztopine ES, VS in WS, ki bo uporabljena, mora biti ogreta na sobno temperaturo (20–27 °C).  
OPOMBA: Izogibajte se ponavljajočemu se temperiranju celotnih vial z raztopino ES, VS in WS na sobno temperaturo, če vsakič potrebujete le del raztopine. Bolje je razdeliti količino, ki bo uporabljena, in vrniti viale na temperaturo 2–8 °C takoj po razdelitvi. Raztopina Washing NX (WS) se uporablja za vitifikacijo oocitov.
2. Napolnite rezervoar za tekoči dušik s tekočim dušikom (LN<sub>2</sub>) – dovolj je, če dosežete globino 4 palcev ali da povsem potopite krioepruveto na palčki – in ga postavite v bližino mikroskopa. Pritrdite krioepruveto ali čašo (brez pokrovčka) na spodnjo sponko kriopalčke in jo potopite v tekoči dušik za pripravo za shranjevanje vitrificiranega vzorca.
3. Določite število vzorcev, ki bodo vitrificirani.
4. Z nalepkami s potrebnimi informacijami označite vse sterilne petrijevke (ali pokrovčke) in kriogensko napravo za shranjevanje.
5. Pred začetkom postopka skrbno preglejte pripomoček za vitifikacijo.
6. Nežno obrnite vsako vialo z raztopinama ES in VS, da pred uporabo premešate vsebino.
7. Pripravite posodo s kapljicami raztopine za postopek vitifikacije, kot sledi:

#### A. Protokol vitifikacije OOCITOV (MII):

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

OPOMBA 2: Za protokol vitifikacije embriev glejte razdelek B.

1. Aseptično nanesite po 20-µl mikrokapljico WS, ES1 in ES2 eno poleg druge, mikrokapljico ES3 pa na obrnjen pokrov sterilne petrijevke, kot je prikazano na sliki 1, nato pa postavite posodo na mizico mikroskopa:
  - eno 20-µl kapljico WS,
  - tri 20-µl kapljice (skupno 60 µl) raztopine ES (ES1, ES2, ES3).
2. Odstranite posodo s kulturo, ki vsebuje oocite MII, iz inkubatorja in preverite kakovost vzorcev pod mikroskopom. Če je mogoče, izberite le najboljšo kakovost oocitov v fazi MII.  
OPOZORILO: Zmanjšajte izpostavljenost vzorca (-ev) svetlobi zaradi ekvibracije v kapljicah WS, ES in VS.
3. Prenesite oocit (do 2 sočasno) z minimalnim volumnom medija iz posode s kulturo (v inkubatorju) v 20-µl kapljico WS za eno minuto.
4. Združite kapljice WS v ES1 (glejte sliko 1, puščica 1) s konico prenosne pipete in za 2 minuti omogočite spontano mešanje obeh raztopin.
5. Nato združite kapljico ES2 (puščica 2) s predhodno združenima kapljicama in pustite 2 minuti.
6. Prenesite oocit(e) z minimalno količino raztopine iz združene kapljice v kapljico ES3 za 6–10 minut.  
Opomba: Ekvibracija oocitov v ES3 je končana, ko sta debelini zona pellucida in perivitelinskega prostora enaki. Oociti se običajno usedejo na dno kapljice v 3 minutah.
7. V času ekvibracije v ES3 aseptično dodajte eno (1) 50-µl kapljico VS, preden se ekvibracija zaključí, in pripravite pripomoček za vitifikacijo po izbiri za nalaganje (slika 2).
8. Naslednji koraki (9–13) morajo biti končani v 80–110 sekundah.  
OPOZORILO: Izpostavljenost vzorcev raztopini VS je treba omejiti, da preprečite citotoksičnost. Vzorca po navadi plavajo v raztopini VS, zato prilagodite fokus mikroskopa, da ohranite neprekinjeno vizualizacijo med izpostavljanjem, v bližini pa imejte konico prenosne pipete, da zagotovite hiter prenos med kapljicami. Glejte sliko 2.
9. Tik preden je ekvibracija v ES končana, splaknite konico prenosne pipete in jo napolnite z VS ter povlecite vzorec (vzorco) z minimalno količino ES v konico pipete ter ga prenesite v kapljico VS za 50–60 sekund. Oocite odložite na dno VS. Med odlaganjem bodo oociti priplavali na vrh VS. Da bi zagotovili popolno splakovanje z VS, oocite s pipetiranjem nežno premaknite nazaj na sredino na dno VS.  
Med tem postopkom se bodo oociti dehidrirali in priplavali nazaj.
10. Napolnite pripomoček za vitifikacijo in ga zatesnite po navodilih proizvajalca.
11. Vitrificiran vzorec (vzorco) na izbranem pripomočku za vitifikacijo vstavite v potopljeno, z LN<sub>2</sub> napolnjeno krioepruveto ali čašo (na kriopalčki) – slika 3. S pokrovčkom zaprite krioepruveto (ali čašo) ali jo priključite obrnjeno navzdol na drugo nezaprto krioepruveto, da boste zavarovali vitrificirani pripomoček v tekočem dušiku.
12. Premaknite rezervoar LN<sub>2</sub> v bližino kriozamrzovalnika LN<sub>2</sub> in prenesite kriopalčko z vsebino v kriozamrzovalnik za dolgotrajno shranjevanje.

#### B. Protokol vitifikacije EMBRIEV (PN do blastociste):

1. Aseptično dodajte eno 50-µl kapljico raztopine ES na obrnjeni pokrov petrijevke (slika 4).
2. Odstranite posodo s kulturo z embriji iz inkubatorja in preverite kakovost vzorcev pod mikroskopom. Če je mogoče, za vitifikacijo izberite le embrije najboljše kakovosti.
3. Predvidno prenesite vzorec (do dva sočasno) z minimalno količino medija iz posode s kulturo v kapljico raztopine ES in zaženite časovnik.  
Embriji se morajo počasi ekvibrirati v kapljici raztopine ES s prostim padcem 6–10 minut.  
OPOMBA 1: Vzorec se bo skrčil in se nato postopno vračal v prvotno velikost, kar pomeni, da je ekvibracija končana.  
OPOZORILO: Zmanjšajte izpostavljenost vzorca svetlobi zaradi ekvibracije v kapljicah ES in VS.

4. V času ekvilibracije v ES aseptično dodajte eno 50- $\mu$ l kapljico raztopine VS, kot prikazuje slika 4, in pripravite pripomoček za vitrifikacijo po izbiri za nalaganje.
5. Tik preden je ekvilibracija v ES končana, splaknite konico prenosne pipete in jo napolnite z VS ter povlecite vzorec (vzorec) z minimalno količino ES v konico pipete ter ga prenesite v kapljico VS za najmanj 30 sekund. Embrie odložite na dno VS. Med odlaganjem bodo embrii priplavali na vrh VS. Da bi zagotovili popolno splakovanje z VS, embrie s pipetiranjem nežno premaknite nazaj na sredino na dno VS.  
OPOMBA 2: Med tem postopkom se bodo embrii dehidrirali in priplavali nazaj.
6. Napolnite pripomoček za vitrifikacijo in ga zatesnite po navodilih proizvajalca.
7. Vitrificirani izbrani pripomoček za vitrifikacijo vstavite v potopljeno, z LN<sub>2</sub> napolnjeno krioepruveto ali čašo (na kriopalčki) – slika 3. S pokrovčkom zaprite krioepruveto (ali čašo) ali jo priključite obrnjeno navzdol na drugo nezaprto krioepruveto, da boste zavarovali vitrificirani pripomoček v tekočem dušiku.
8. Premaknite rezervoar LN<sub>2</sub> v bližino kriozamrzovalnika LN<sub>2</sub> in prenesite kriopalčko z vsebino v kriozamrzovalnik za dolgotrajno shranjevanje.

Dodatne podrobnosti o uporabi teh izdelkov določajo notranji laboratorijski postopki in protokoli vsakega laboratorija, ki so bili posebej razviti in optimizirani za zadevni medicinski program.

#### **NAVODILA ZA SHRANJEVANJE IN STABILNOST**

Neodprte vialo shranjujte v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C. Če shranjujete po navodilih, so raztopine kompleta Vit Kit – Freeze NX stabilne do izteka roka uporabnosti, ki je naveden na nalepki na viali.

Ko vsebnike odprete, medija ne uporabljajte več kot štirinajst (14) dni.

Ker izdelek vsebuje materiale človeških virov, se med hrambo lahko razvijejo določeni delci. Za to vrsto delcev ni znano, da bi vplivala na učinkovitost izdelka.

#### **PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILO**

Ta pripomoček sme uporabljati samo osebe, ki je usposobljeno za postopke asistiranje reprodukcije. Ti postopki vključujejo predvideno uporabo, za katero je ta pripomoček zasnovan.

Ustanova, v kateri dela uporabnik tega pripomočka, je odgovorna za vzdrževanje sledljivosti izdelka in mora upoštevati nacionalne predpise glede sledljivosti, kjer je to ustrezno.

Ne uporabljajte vialo z raztopino, na kateri so znaki poškodb, puščanja, delcev ali motnosti. Izdelek zavrzite skladno z veljavnimi predpisi.

Za preprečitev kontaminacije morate pri ravnanju z izdelkom uporabljati aseptične tehnike.

Trenutno raziskovalna literatura kaže, da dolgoročni učinki vitrifikacije na oocyte in embrie ostajajo neznani.

Ne uporabite nobene steklenice, če je njena sterilna embalaža poškodovana.

EU: Standardni ukrepi za preprečevanje okužb, ki izhajajo iz uporabe medicinskih izdelkov, pripravljenih iz človeške krvi ali plazme, vključujejo selekcijo darovalcev, presejanje posameznih darovanih bioloških materialov in združene plazme za specifične označevalce okužbe in vključitev učinkovitih proizvodnih korakov za inaktivacijo/odstranitev virusov. Kljub temu pri uporabi medicinskih izdelkov, pripravljenih iz človeške krvi ali plazme, ni mogoče popolnoma izključiti prenosa povzročiteljev kužnih bolezni. To velja tudi za viruse, ki so še neznani ali so se začeli širiti pred kratkim, in druge patogene. O dokazanih prenosih virusov z albuminom, proizvedenim skladno s specifikacijami Evropske farmakopeje in uveljavljenimi postopki, ni nobenih poročil. Zelo priporočljivo je, da se ob vsaki uporabi izdelkov za reproduktivne postopke proizvajalca FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. pri bolniku zapišeta ime in serijska številka izdelka, da se ohrani povezava med bolnikom in serijo izdelka.

ZDA: Ta izdelek vsebuje humani serumski albumin (HSA). Izhodni material človeškega izvora, ki se uporablja pri proizvodnji tega izdelka, je bil testiran z uporabo kompletov, potrjenih s strani FDA; testi so pokazali, da ni reaktiven na protitelesa proti hepatitisu C (HCV) in na protitelesa proti virusu humane imunske pomanjkljivosti (HIV). Vendar nobena testna metoda ne more popolnoma zagotoviti, da izdelki, pridobljeni iz človeških virov, niso kužni. Pri ravnanju z vsemi materiali človeškega izvora upoštevajte možno tveganje prenosa okužbe, tj. uporabljajte univerzalne previdnostne ukrepe. Pri darovalcih izvornega materiala je bilo opravljeno tudi presejanje za CJB.

#### **KONTRAINDIKACIJE**

Izdelek vsebuje gentamicinijev sulfat. Izvesti je treba ustrezne previdnostne ukrepe za zagotavljanje, da bolnik ni občutljiv za ta antibiotik.