

VitriFreeze ES™

VitriThaw ES™

Наборы универсальных сред для витрификации и оттаивания эмбрионов человека: зигота, стадия дробления, бластоцисты

Документ №: FP09 I46 02 R01 D.5

Дата издания: 13.07.2015 г.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VitriFreeze ES и VitriThaw ES (VitriFreeze/Thaw ES) представляют собой наборы сред для витрификации и оттаивания эмбрионов человека. Набор сред и протокол для витрификации на ранней стадии (Early stage, ES) предназначены для использования с эмбрионами человека на стадиях от 2PN до бластоцист.

ВВЕДЕНИЕ

Витрификация - это процедура криоконсервации, при которой жидкий раствор переходит в аморфное твердое состояние без образования кристаллической структуры (Rall and Fahy 1985). Эта методика может быть более благоприятной, чем медленное охлаждение (Stehlik 2005).

Сверхбыстрая витрификация зигот и эмбрионов с использованием «открытых» систем, таких как «Hemi-Straw» и «VitriPlug», допускающих прямой контакт с жидким азотом, обеспечила большое количество рождений здоровых детей (Vanderzwalmen, 2003).

В соответствии с Европейским законодательством в области требований к безопасности медицинских устройств для криоконсервации человеческих клеток, были разработаны герметично закрытые (асептические) контейнеры, которые позволяют избежать прямого контакта эмбриона с жидким азотом при замораживании и длительном хранении. С этой целью были разработаны системы HSV (High Security Vitrification kit, CryoBioSystem) и VitriSafe Plug (MTG) (Vanderzwalmen, 2009). Оба носителя состоят из внутренней соломинки с желобком, в котором размещают небольшой объем криопротекторной среды с одним или двумя эмбрионами. Далее внутренняя соломинка помещается во внешнюю, защитную соломинку, которая запечатывается до погружения в жидкий азот.

Тем не менее, из-за термоизоляции скорость охлаждения в таких системах снижена по сравнению с «открытыми» системами хранения. В связи с этим требуется, чтобы большее количество криопротектора проникло в клетки для гарантированного сохранения внутриклеточного состояния.

Набор сред VitriFreeze ES разработан таким образом, чтобы достаточное количество криопротектора могло проникать в эмбрион на разных стадиях его развития. Во время оттаивания набор сред VitriThaw ES обеспечивает постепенное удаление криопротекторов.

СОСТАВ

VitriFreeze ES / VitriThaw ES представляют собой основанные на ДМСО/этиленгликоле витрификационные среды, содержащие также фосфатно-солевой буфер, сахарозу, фикоилл и человеческий сывороточный альбумин (10-20 г/л).

Среды VitriFreeze ES / VitriThaw ES не содержат антибиотиков.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Набор VitriFreeze ES (каталожный номер VF_KIT1_ES)
 - 1 фл. среды для предварительной инкубации VitriFreeze ES Pre-incubation medium
 - 1 фл. среды для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 1 (5% ДМСО – 5% этиленгликоля)

- 1 фл. среды для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 2 (10% ДМСО – 10% этиленгликоля)

- 1 фл. среды для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 3 (20% ДМСО – 20% этиленгликоля)

- Набор VitriThaw ES (каталожный номер VT_KIT1_ES)

- 1 фл. среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 1

- 1 фл. среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 2

- 1 фл. среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 3

- 1 фл. среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 4

- 1 фл. среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 5

Внимание! Среда должны использоваться в показанном выше порядке; поставляемого объема сред хватает приблизительно на 4 процедуры.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Чашки с лунками
- Емкость для замораживания с жидким азотом
- Водяная баня, способная поддерживать температуру 37 °С
- Дозирующие пипетки
- Щипцы
- Носители для витрификации
- Ламинарный шкаф (класса 5 ISO)
- Микроскоп
- Таймер лабораторный

VITRIFREEZE ES / VITRITHAW ES И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ

Среды VitriFreeze ES и VitriThaw ES могут использоваться в комбинации со средами GAIN medium и FertiCult Flushing medium до замораживания и после оттаивания.

СПЕЦИФИКАЦИЯ ПРОДУКТА

- Химический состав
- pH: 7,20 – 7,40
- Осмоляльность
 - среда для предварительной инкубации VitriFreeze ES Pre-incubation medium: 270-290 mOsm/kg
 - среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 2: 805-850 mOsm/kg
 - среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 3: 535-565 mOsm/kg
 - среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 4: 405-435 mOsm/kg
 - среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 5: 270-290 mOsm/kg
- Бактериальные эндотоксины: < 0,25 ЕЭ/мл
- Стерильность: Стерильно (SAL 10⁻³)
- Биотест на эмбрионах мышей (бластоцисты после 96 ч): ≥ 80%
- Используются исходные материалы качества Евр. Фарм. или Фарм. США, где применимо
- Сертификат анализа и паспорт безопасности: по запросу

ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

- Не используйте продукт, если он стал мутным или проявляет любые признаки микробиологического загрязнения;
- Не используйте продукт, если защитный колпачок флакона снят или поврежден при доставке продукта.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ

- хранить при температуре 2 °С – 8 °С;

- не замораживать перед использованием;
- хранить в защищенном от света месте;
- продукты могут быть безопасно использованы в течение 7 дней после вскрытия при условии соблюдения стерильности и хранения при температуре от 2 °С до 8 °С;
- Не использовать после истечения срока годности.
- Продукт устойчив к транспортировке при повышенных температурах (до 5 суток при температуре до 37 °С).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Стандартные меры профилактики инфекций, возникающих от использования медицинских изделий, приготовленных из крови или плазмы человека, включают выбор доноров, скрининг индивидуального донорского материала и пулов плазмы на специфические маркеры инфекций, и включение эффективных этапов производства для инактивации/удаления вирусов. Несмотря на это, при использовании медицинских изделий, приготовленных из крови или плазмы человека, вероятность передачи инфекционных агентов не может быть полностью исключена. Это также относится к неизвестным или появляющимся вирусам и другим патогенам. Отчеты о доказанной передаче вирусов с помощью альбумина, произведенного в соответствии со спецификациями Европейской Фармакопеи с помощью установленных процессов, отсутствуют. Таким образом, работайте со всеми образцами так, как если бы они могли передавать ВИЧ или гепатит.

Всегда надевайте защитную одежду при работе с образцами. Всегда работайте со строгим соблюдением условий гигиены во избежание возможной контаминации (напр., с использованием ламинарного шкафа класса ISO 5).

Использовать только для целевого применения. Долгосрочная безопасность витрификации эмбрионов в отношении детей, рожденных с применением данной процедуры, не установлена.

МЕТОД

Перед применением удостоверьтесь, что все среды хорошо перемешаны.

Внимательно прочитайте все нижеизложенные этапы процедур витрификации/оттаивания перед началом работы

Предварительные этапы

В 4-луночной чашке заполните первую лунку 250-300 мкл среды для предварительной инкубации VitriFreeze ES Pre-incubation medium, вторую – средой для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 1, третью – средой для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 2, четвертую – средой для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 3.

Примечание: объем заполнения второй – четвертой лунок может составлять 250-300 мкл.

Далее вскройте столько носителей для витрификации, сколько необходимо для этапа витрификации, учитывая, что 1 носитель (соломинка) удерживает от 1 до 2 эмбрионов (прочтите инструкцию по применению носителя, который Вы используете). Удобно разложить составные части носителей на рабочей поверхности для упрощения их дальнейшего использования в процедуре.

На одной подготовленной, как описано выше, чашке с витрификационными средами можно провести до 5 циклов витрификации (для одного и того же пациента!). **Не использовать одну и ту же чашку со средами для разных пациентов!**

Протокол замораживания с использованием закрытого (асептического) носителя

Нагрейте все среды набора до комнатной температуры (22 °С) до их использования.

Перенесите эмбрионы из среды для культивирования в каждую из сред набора VitriFreeze ES поочередно по следующей схеме:

Стадия развития	Пред-инкубационная среда VitriFreeze ES Pre-incubation medium, время выдерживания	Среда для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 1, время выдерживания	Среда для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 2, время выдерживания	Среда для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 3, время выдерживания
Зигота – 2-клеточная стадия	2 минуты	5-10 минут	4-5 минут	40-60 секунд
4-8-клеточная стадия	2 минуты	5-7 минут	4 минуты	40-60 секунд
Морула	2 минуты	5-7 минут	4 минуты	40-60 секунд
Ранние бластоцисты	2 минуты	5-7 минут	4 минуты	40-60 секунд
Расширенные бластоцисты	2 минуты	5-10 минут	4 минуты	40-60 секунд

Примечание: полный процесс помещения эмбриона в среду для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 3, помещения эмбриона в носитель для витрификации, помещение носителя во внешнюю соломинку (если применимо) и ее запечатывание не должен занять более 60 секунд перед погружением носителя в жидкий азот. Если весь процесс занял более 60 секунд, отметьте это и впоследствии проанализируйте полученные результаты.

Внимание! Важно, чтобы биологический образец и среды для замораживания имели одну и ту же температуру!

Примечание: по желанию оператора все процедуры замораживания эмбрионов на указанных стадиях могут проводиться при температуре 37 °C.

Протокол замораживания с использованием открытого носителя

Нагрейте все среды набора до комнатной температуры (22 °C) до их использования.

Перенесите эмбрионы из среды для культивирования в каждую из сред набора VitriFreeze ES поочередно по следующей схеме:

Стадия развития	Пред-инкубационная среда VitriFreeze ES Pre-incubation medium, время выдерживания	Среда для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 1, время выдерживания	Среда для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 2, время выдерживания	Среда для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 3, время выдерживания
Зигота – 2-клеточная стадия	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд
4-8-клеточная стадия	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд

Морула	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд
Ранние бластоцисты	2 минуты	2 минуты	3 минуты	30-40 секунд
Расширенные бластоцисты*	2 минуты	2 минуты	4 минуты	30-40 секунд

* Если используется искусственное редуцирование: Для снижения негативного воздействия бластоцеля, до начала процедуры витрификации расширенные бластоцисты должны быть сжаты путем искусственного редуцирования объема бластоцеля с помощью стеклянной пипетки (Vanderzwalmen et al, 2002, Son et al., 2003).

Примечание: полный процесс помещения эмбриона в среду для замораживания VitriFreeze ES Freezing medium 3, помещения эмбриона в носитель для витрификации, помещения носителя во внешнюю соломинку (если применимо) и ее запечатывания не должен занять более 60 секунд перед погружением носителя в жидкий азот. Если весь процесс занял более 60 секунд, отметьте это и впоследствии проанализируйте полученные результаты.

Внимание! Важно, чтобы биологический образец и среды для замораживания имели одну и ту же температуру!

Примечание: по желанию оператора все процедуры замораживания эмбрионов на указанных стадиях могут проводиться при температуре 37 °С.

Протокол оттаивания с использованием закрытого (асептического) носителя

Примечание: при подготовке к оттаиванию могут использоваться схожие предварительные этапы, что и при подготовке сред для замораживания: чашка с 6 лунками, наполнение по 250-300 мкл сред для оттаивания. На первом шаге оттаивания оператор может по желанию увеличить добавляемый объем среды для оттаивания 1 для большего немедленного разведения криопротекторных агентов.

Нагрейте среду для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 1 до 37 °С, а все остальные среды – до комнатной температуры (22 °С) до их использования.

Стадия развития	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 1	Смесь среды для оттаивания 1 и среды для оттаивания 2*	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 2	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 3	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 4	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 5
Зигота – 2-клеточная стадия	1 минута	1 минута	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	Промывайте в течение 1-2 минут до переноса эмбрионов в культуральную среду
4-8-клеточная стадия	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
Морула	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
Ранние бластоцисты	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
Расширенные бластоцисты	1-1,5 минуты	1-1,5 минуты	1-2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	

* смешайте одну часть среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 1 и одну часть среды для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 2

Протокол оттаивания с использованием открытого носителя

Примечание: при подготовке к оттаиванию могут использоваться схожие предварительные этапы, что и при подготовке сред для замораживания: чашка с 6 лунками, наполнение по 250-300 мкл сред для оттаивания. На первом шаге оттаивания оператор может по желанию увеличить добавляемый объем среды для оттаивания 2 для большего немедленного разведения криопротекторных агентов.

Нагрейте среду для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 2 до 37 °С, а остальные среды – до комнатной температуры (22 °С) до их использования.

Стадия развития	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 2	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 3	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 4	Среда для оттаивания VitriThaw ES Thawing medium 5
Зигота – 2-клеточная стадия	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	Промывайте в течение 1-2 минут до переноса эмбрионов в культуральную среду
4-8-клеточная стадия	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
Морула	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
Ранние бластоцисты	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	
Расширенные бластоцисты	2 минуты	2-4 минуты	2-4 минуты	

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

FertiPro N.V., Бельгия

www.fertipro.com

ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ:

ООО «Селл Диагностик»

Адрес для почтовых отправлений: 220020 Минск, а/я 5

Тел.: +375 29 391 16 90

Факс: +375 17 395 88 09

E-mail: cell.diagnost@gmail.com

www.celldiagnostic.by



0344 **STERILE A**

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rall W. et Fahy G. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, Nature, 313, 573
2. Stehlik E., Stehlik J., Katayama K., et al. (2005) Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. RBMOnline, 11, 53-7
3. Son W.Y., Yoon S.H., Yoon H.J., Lee S.M. and Lim J.H. (2003) Pregnancy outcome following transfer of human blastocyst vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele, Hum. Reprod., 18, 137-139
4. Vanderzwalmen P., Ectors F., Grobet L. et al. (2009) Development of an aseptic vitrification technique: application to blastocysts originating from infertile patients, egg donors and after in vitro maturation. RBMOnline, 19, 700-7
5. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C.H., Standaert V., Bollen N., van Roosendaal E., Vandervorst M., Schoysman R. and Zech H. (2003) Vitrification of human blastocyst with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. Hum. Reprod., 18(7), 1504-11
6. Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C.H., Standaert V., van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahash K. and Schoysman R. (2002) Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effects of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification, Hum. Reprod., 17, 744-751
7. Ebner T., Vanderzwalmen P., Wirleitner B. (2015). Atlas of vitrified blastocyst in human Assisted reproduction. Cambridge University Press