

## Набор для витрификации (заморозка)

Предназначено исключительно для проведения лабораторных процедур.  
Пользователь обязан ограничить использование сред в других целях.

Описание продукта	Кат.№	Раствор для эквilibрации Кат.№ ART-8025-A	Раствор для витрификации Кат.№ ART-8025-B	Соломины для витрификации HSV
Набор для витрификации (заморозка)	ART-8025	1 x 2мл	1 x 2мл	

### Назначение:

Набор предназначен для сверхбыстрого замораживания зигот, эмбрионов и бластоцист человека в программах ВРТ. Для размораживания следует использовать Набор для витрификации (разморозка) (Кат.№ ART-8030).

### Описание продукта:

Набор позволяет эффективно замораживать зиготы и эмбрионы на стадии дробления. Данная инструкция содержит протокол заморозки, позволяющий добиться высоких показателей выживаемости эмбрионов.

- **Раствор для эквilibрации (Кат.№ ART-8025-A)** представляет собой модифицированную среду НТФ с буфером MOPS, с добавлением заменимых и незаменимых аминокислот, 10мг/л аминогликозидного антибиотика гентамицина, 12 мг/мл сывороточного альбумина человека и 0,003 мг/мл фенолового красного, 7,5% (об/об) ДМСО и 7,5% (об/об) этиленгликоля.
- **Раствор для витрификации (Кат.№ ART-8025-B)** представляет собой модифицированную среду НТФ с буфером MOPS, с добавлением заменимых и незаменимых аминокислот, 10мг/л аминогликозидного антибиотика гентамицина, 12 мг/мл сывороточного альбумина человека и 0,003 мг/мл фенолового красного, 15% (об/об) ДМСО, 15% (об/об) этиленгликоля и 0,6М сахарозы.

### Меры предосторожности:

**Внимание:** Влияние витрификации бластоцист на здоровье рождающихся в результате применения данной процедуры детей в долгосрочной перспективе не изучено.

**Осторожно:** Безопасность и эффективность витрификации эмбрионов человека, не достигших стадии бластоцисты, полностью не изучены. На данный момент существуют данные о рождении детей после витрификации дробящихся эмбрионов на 3 день развития (Desai et al., 2007), а также данные о клинических беременностях после витрификации зигот (Selman, El-Danasouri,, 2002).

**Внимание:** Эмбриолог, приступающий к витрификации и разморозке бластоцист, должен прочесть и понять инструкцию по применению, предостережения и меры предосторожности и отработать методику использования наборов для замораживания и разморозки.

Используйте официально зарегистрированный носитель для витрификации, предназначенный для витрификации бластоцист.

- Набор включает достаточное количество сред для проведения только одной процедуры.
- Не используйте среду, если она помутнела, не окрашена в розовый цвет, или в ней обнаруживаются частицы.
- Во избежание контаминации, используйте среду в стерильных условиях и сливайте неиспользованный остаток среды из флакона.
- Исследования показывают, что в нераспечатанном флаконе продукт сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Все компоненты набора содержат альбумин, получаемый из крови человека.

**Осторожно:** Работа со всеми производными крови должна проводиться как с потенциально инфекционно опасными веществами. Тестирование исходного материала для получения данного продукта на наличие антител к ВИЧ и ВГ дало отрицательные результаты. HbsAg, РНК HCV, РНК ВИЧ-1 и HBV при анализе исходного материала

также не были обнаружены. Обследование доноров крови проводится каждые 4 месяца, все доноры имеют негативный результат анализа на сифилис. Ни один из существующих методов скрининга не гарантирует, что продукты, полученные из человеческой крови, не содержат инфекционных агентов.

Доноры источника материала были проверены на болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD). Благодаря эффективному обследованию доноров и процессу производства продукции риск передачи вирусной инфекции практически отсутствует. Теоретическая вероятность передачи болезни Крейтцфельда-Якоба также считается крайне низкой. За все время использования продукта не было выявлено ни одного случая передачи вирусной инфекции или болезни Крейтцфельда-Якоба через альбумин.

Стандартные методы предотвращения заражения в результате использования медицинской продукции, произведенной из крови или плазмы человека, включают отбор доноров, обследование донорского материала и пулов плазмы на специфические маркеры инфекции и внедрение эффективных мер для дезактивации/ликвидации вирусов на производстве. Несмотря на эти меры, возможность передачи возбудителей инфекции в результате применения медицинской продукции, произведенной из крови или плазмы человека, не может быть исключена полностью. Это касается также возможности передачи неизвестных или новых вирусов и других патогенов. Случаи передачи вирусов с альбумином, произведенным согласно требованиям Европейской Фармакопеи посредством утвержденных производственных процедур, не описаны.

**Одноразовое использование:** В целях предупреждения контаминации следует работать со средой в стерильных условиях и выливать остатки среды из флакона или пробирки после окончания процедуры.

Среды для ВРТ предназначены только для однократного применения. Результатом повторного использования сред может стать работа с просроченным продуктом и высокий риск бактериальной контаминации материала.

При использовании просроченных или заражённых сред условия *in vitro* могут быть значительно хуже необходимых для нормального оплодотворения и развития эмбрионов, что может привести к нарушению развития эмбрионов, их неспособности к имплантации и, как следствие, безрезультатной попытке ЭКО.

**Внимание:** Продукт содержит антибиотик гентамицин сульфат. Перед применением необходимо удостовериться, что пациент не сенсibilизирован по отношению к данному препарату.

#### **Контроль качества:**

Растворы, входящие в состав данного набора, стерилизованы фильтрацией и произведены в асептических условиях согласно стандартам cGMP, обеспечивающим стерильность на уровне SAL 10<sup>-3</sup>.

Каждый лот продукции проходит тестирование следующими методами:

- Определение уровня эндотоксина методом LAL. Уровень эндотоксина согласно USP критериям не превышает <1 МЕ/мл.
- Оценка эмбриотоксичности с помощью исследования на 1-клеточных эмбрионах мыши (MEA, Mouse Embryo Assay). Показано формирование 80% и более бластоцист.
- Определение уровня стерильности USP Sterility Test <71>
- Результаты всех тестов для каждого лота продукции отображаются в соответствующем сертификате анализа, предоставляемом по запросу.

#### **Необходимые материалы, не входящие в состав набора**

- Стерильные чашки Петри (50x9мм, Falcon 351006 или эквивалент) или 4-луночные планшеты (лунки объемом 1мл, Nunc 176740 или эквивалент)
- Криопробирки, гоблеты или другие необходимые аксессуары для хранения материала в жидком азоте
- Перчатки
- Пипетки для переноса материала - стеклянные пипетки или пластиковые капилляры, кончик которых имеет внутренний диаметр приблизительно 200мкм
- Пинцеты
- Таймер или секундомер
- Контейнер с крышкой для жидкого азота объемом 1-2литра

- Жидкий азот (в объёме, достаточном для достижения глубины 15см)

### **Инструкция по применению:**

Для проведения одной процедуры витрификации (за один раз можно витрифицировать максимум две бластоцисты) необходимо следующее количество сред:

- Раствор для эквilibрации (ES): 20мкл - 1 мл
- Раствор для витрификации (VS): 80мкл - 1 мл

Следуйте инструкции выбранного носителя для витрификации и аксессуаров для хранения.

### **Методика витрификации бластоцист**

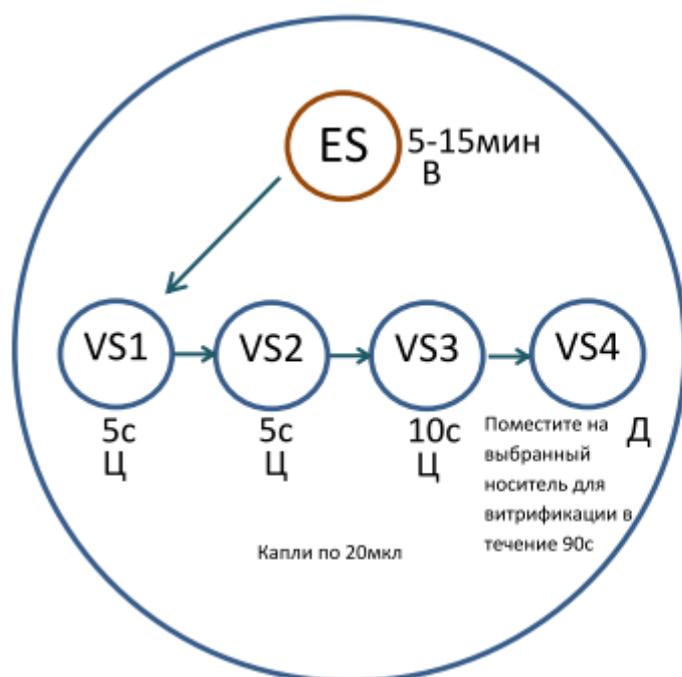
Процедура витрификации проводится при комнатной температуре (20-25°C). Отключайте нагреваемое стекло микроскопа во время проведения процедуры. Воздействие света на бластоцисты во время инкубации в растворах для эквilibрации и витрификации необходимо свести к минимуму. Перед использованием нагрейте растворы до комнатной температуры.

#### **А. Процедура витрификации с использованием микро-капель растворов**

1. Наполните резервуар для жидкого азота или криованну жидким азотом до уровня, обеспечивающего полное погружение закреплённой на держателе криопробирки или гоблета. Поставьте резервуар с жидким азотом рядом с микроскопом. Закрепите криопробирку или гоблет на держателе и погрузите в жидкий азот чтобы подготовиться к хранению витрифицированного материала.
2. Определите, какое количество эмбрионов должно быть витрифицировано.
3. Напишите необходимые данные на каждой стерильной чашке Петри, носителях для витрификации и аксессуарах для хранения.
4. Хорошо перемешайте содержимое флаконов с Растворами для эквilibрации и витрификации, аккуратно переворачивая флаконы несколько раз.
5. На поверхность перевёрнутой крышки чашки Петри в стерильных условиях нанесите одну каплю Раствора для эквilibрации (ES) объёмом 20мкл (см. Рис.1)
6. Достаньте культуральную чашку с бластоцистами из инкубатора и оцените качество бластоцист. По возможности, витрифицируйте только экспандированные бластоцисты отличного качества.
7. Аккуратно перенесите бластоцисты (не более двух одновременно) в минимальном объёме культуральной среды на поверхность капли Раствора для эквilibрации (ES) и запустите таймер. Оставьте бластоцисты для эквilibрации в капле ES на 5-15минут, они будут постепенно погружаться на дно. При этом бластоцисты сначала сожмутся, а затем начнут постепенно расправляться. Восстановление бластоцистой первоначального объёма свидетельствует о завершении процедуры эквilibрации.
8. Во время эквilibрации бластоцист в ES, подготовьте 4 капли по 20мкл Раствора для витрификации (см. Рис.1)
9. Все дальнейшие действия должны быть завершены в течение 90-110секунд
10. После завершения этапа эквilibрации в ES, наберите немного ES в пипетку и перенесите бластоцисты в минимальном объёме среды в центр первой капли Раствора для витрификации VS (VS1) на 5 секунд.
11. Быстро перенесите бластоцисты из первой капли VS в центр второй капли VS (VS2) на 5 секунд.
12. Перенесите бластоцисты из VS2 в центр третьей капли VS (VS3) на 10 секунд.
13. Перенесите бластоцисты из VS3 на дно четвёртой капли VS (VS4).
14. Для витрификации бластоцист, следуйте инструкции производителя для выбранного носителя для витрификации. Осторожно перенесите бластоцисты из капли VS4 в менее чем 1мкл среды VS на носитель для витрификации и следуйте указаниям инструкции по использованию выбранного носителя.
15. Если необходимо витрифицировать более 2х бластоцист, повторите этапы 4-14, используя свежие капли ES и VS.

**Внимание:** Время между помещением blastocysts в первую каплю раствора VS (VS1) и их погружением в жидкий азот ни в коем случае не должно превышать 110 секунд (см. п.9).

**Хранение в жидком азоте:** Все манипуляции с витрифицированным материалом должны производиться под жидким азотом во избежание случайного размораживания. Перенесите витрифицированный материал в подписанную криопробирку/гоблет, закреплённую на держателе, закройте перевёрнутой криопробиркой/гоблетом и переместите на хранение в криобанк.



**Рис.1**

**Обозначения:**

ES – Раствор для эквilibрации

VS – Раствор для витрификации

→ - Перенесите в следующую каплю

В – Перенесите на поверхность капли

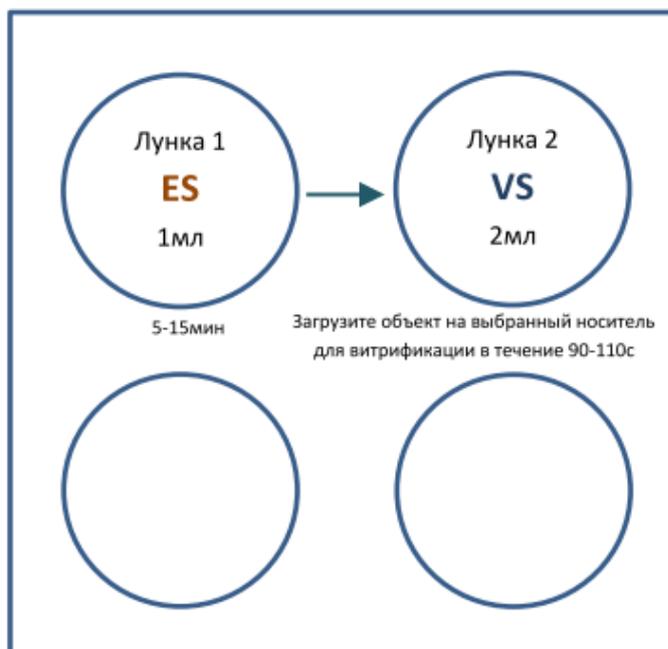
Ц - Перенесите в центр капли

Д - Перенесите на дно капли

**Б. Процедура витрификации с использованием больших объёмов растворов в 4-луночном планшете**

1. Наполните резервуар для жидкого азота или криованну жидким азотом до уровня, обеспечивающего полное погружение закреплённой на держателе криопробирки или гоблета. Поставьте резервуар с жидким азотом рядом с микроскопом. Закрепите криопробирку или гоблет на держателе и погрузите в жидкий азот чтобы подготовиться к хранению витрифицированного материала.
2. Определите, какое количество эмбрионов должно быть витрифицировано.
3. Напишите необходимые данные на каждой стерильной чашке Петри, носителях для витрификации и аксессуарах для хранения.
4. Хорошо перемешайте содержимое флаконов с Растворами для эквilibрации и витрификации, аккуратно переворачивая флаконы несколько раз.
5. Налейте в стерильных условиях 1мл Раствора для эквilibрации в первую лунку 4-х луночного планшета, и 1мл Раствора для витрификации – во вторую (см. Рис.2).
6. Достаньте культуральную чашку с blastocysts из инкубатора и оцените качество blastocysts. По возможности, витрифицируйте только экспандированные blastocysts отличного качества.
7. Аккуратно перенесите blastocysts (не более двух одновременно) в минимальном объёме жидкости на поверхность среды первой лунки планшета в Раствор для эквilibрации (ES) и запустите таймер. Blastocysts должны эквilibроваться в течение 5-15минут, при этом они будут постепенно погружаться на дно. После помещения в Раствор для эквilibрации blastocysts сначала сожмутся, а затем начнут постепенно расправляться. Восстановление blastocystой первоначального объёма свидетельствует о завершении процедуры эквilibрации.
8. После завершения этапа эквilibрации в ES, наберите немного ES в пипетку и перенесите blastocysts в минимальном объёме среды в центр второй лунки в Раствор для витрификации VS.
9. Осторожно перемешивайте Раствор для витрификации вокруг blastocysts в течение 20-30секунд.

10. Для витрификации бластоцист, следуйте инструкции производителя для выбранного носителя для витрификации. Осторожно перенесите бластоцисты из капли VS4 в менее чем 1мкл среды VS на носитель для витрификации и следуйте указаниям инструкции по использованию выбранного носителя.
11. Если необходимо витрифицировать более 2х бластоцист, повторите этапы 7-11, используя свежие растворы ES и VS.



**Рис.2**

**Обозначения:**

ES – Раствор для эквilibрации

VS – Раствор для витрификации

→ - Перенесите в следующую каплю

**Стабильность и условия хранения:**

- Закрытые упаковки среды хранить при температуре от 2 до 8 °С.
- Перед использованием нагреть до комнатной температуры (20-25°С).
- Не замораживать.
- Не нагревать выше 39°С.
- Отбирайте необходимое количество продукта в стерильных условиях.
- Запрещается выливать отобранную среду обратно во флакон.
- Продукт сохраняет стабильность до истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Не используйте продукт, если он стал бесцветным, мутным или имеет признаки микробиологической контаминации.

**SAGE In Vitro Fertilization™** производит полный спектр продуктов для специалистов в области репродуктивной медицины. За последней версией каталога, а также за любой профессиональной информацией обращайтесь, пожалуйста, к представителю компании.

Телефон службы поддержки: 8 (812) 318-02-90

**Литература:**

1. Liebermann J, Tucker MJ. 2006 Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. FertilSteril 86:20-26.
2. Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. 2005. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. Fertil Steril 84:88-92.

3. Raju GAR, Haranath GB, Krishna KM, et al. 2005. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online* 11:434-437.
4. Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, et al. 2004. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Human Reprod* 19:2884-2888.
5. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, et al. 2005. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 11:53-57.
6. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, et al. 2003. Vitrification of human blastocysts with the hemiStraw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Human Reprod* 18:1504-1511.
7. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. 2005. Comparison of open and closed methods for Well 1ES 1 mL Well 2 VS 1 mL 5-15 min Load carrier device within 90-110 sec vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 11:608-614.
8. Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, et al. 2007. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod Biomed Online* 14:208-213.
9. Selman HA, El-Danasouri I. 2002 Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril* 77:422-423.
10. Camus A, Clairaz P, Ersham A, et al. 2007 Comparison of the processes of five different Vitrification devices. *Gynecol Obstet Fertil* 34:737-745.

**Значение символов:**

Кат.№



Номер партии



Использовать до (год, месяц, день)



Не использовать повторно



Температура хранения



Стерилизовано мембранной фильтрацией  
(SAL 10<sup>-3</sup>)



Aseptic Technique Sterilization  
Membrane Filtered (SAL 10<sup>-3</sup>)

**Внимание!**

Обратитесь к инструкции по использованию



Продукт соответствует требованиям Medical  
Device Directive



Product conforms to the Medical Device  
Directive 93/42/EEC

Производитель



**Представительство в России:**

ООО «ОРИДЖИО»  
196158, Санкт-Петербург,  
Пулковское шоссе 40/4 литер А  
БЦ «Технополис»  
Тел. 8 (812) 318-02-90  
[Info-ru@origio.com](mailto:Info-ru@origio.com)  
[www.origio.ru](http://www.origio.ru)



SAGE In Vitro Fertilization, Inc.  
a CooperSurgical Company  
95 Corporate Drive  
Trumbull, CT 06611 USA



SAGE In Vitro Fertilization  
1979 East Locust Street  
Pasadena, CA 91107 USA