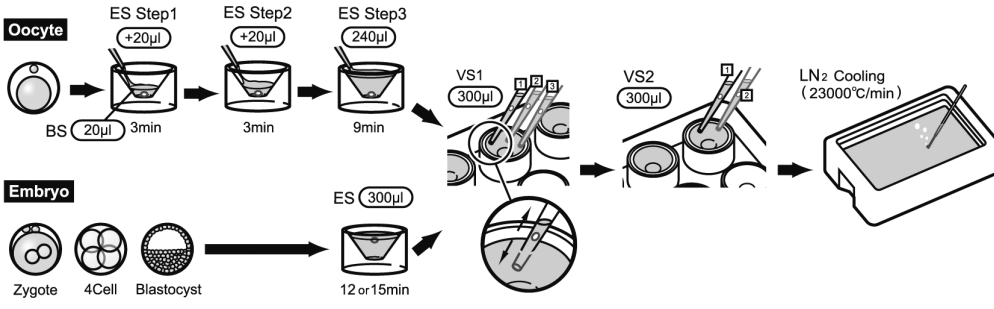


# Vitrification Cryotop Method for Oocyte and Embryo Vitrification Media

Code:VT801



Symbols on the Label

June, 1, 2015 Ver.5

	Sterilized Using Aseptic Processing Techniques
	Sterilized Using Irradiation
	Do not reuse
	Catalog Number
	Batch Code
	Use by
	Storage Temperature
	CE mark
	Manufacturer
	Do not re-sterilize
	Do not use if package is damaged
	Consult Instructions for use

**EN: Intended use**

- Vitrification Media is to be used for vitrifying Oocytes and Embryos.
- CAUTION:** Sterile if the package is unopened or undamaged. Do not use if packaging is broken.

**Vitrification Media**

- No.0 Basic Solution (BS): 1 X 1.5ml vial (only for Oocyte Vitrification)
- No.1 Equilibration Solution (ES): 1 X 1.5ml vial
- No.2 Vitrification Solution (VS): 2 X 1.5ml vials

**Recommended equipment**

- Cryotop: 1 Cryotop stores up to 4 Oocytes or 4 Embryos as a recommendation.
- Repro Plate: with 6 wells

**Instructions for use (IFU)**

- Preparation**
- Fill 90% of the Cooling Rack with fresh liquid nitrogen.
  - Compare the width of perivitelline space with the thickness of zona pellucida and record it.
- NOTE:** Use a pasteur pipette that has a suitable internal diameter for Oocyte (External diameter: 120µm) or Embryo.

**EQUILIBRATION**

- CAUTION:** Equilibration procedures for Oocyte and Embryo are different.

**Oocyte Equilibration**

- Drop 20µl for BS and 300µl each for VS1 and VS2 on the Repro Plate with micro pipette.
- Transfer the Oocyte from the culture dish to the BOTTOM of BS.
- Step 1. Add ES 20µl gently to the TOP of BS and leave it for 3 minutes.
- Step 2. Add another ES 20µl gently to the TOP of BS and leave it for 3 minutes.
- Step 3. Add another ES 240µl gently to the TOP of BS and leave it for 9 minutes.

**Embryo Equilibration**

- Drop 300µl for ES, VS1 and VS2 on the Repro plate using micro pipette.
- Transfer the Embryo to the TOP centre of ES.
- It will spontaneously begin to shrink and then gradually return to its original size by absorbing the ES solution (within 15 minutes).

**VITRIFICATION**

- CAUTION:** The following steps from 4 to 9 should be completed between 60 and 90 seconds.
- Aspirate the Oocyte (Embryo) in ES at the tip of pasteur pipette. Transfer the Oocyte (Embryo) to the TOP center of VS1.
- Aspirate the Oocyte (Embryo) with pasteur pipette and blow it out. Repeat this process 3 times, changing the position in VS1.
- Transfer the Oocyte (Embryo) to VS2. Move the Oocyte (Embryo) changing positions twice in VS2 with pasteur pipette.
- Place the Oocyte (Embryo) by the black line on the Cryotop. Make a planar droplet.
- Check if the Oocyte (Embryo) is on the Cryotop with a minimal volume of VS2 (less than 0.1µl) under the microscope.
- Quickly plunge the Cryotop into the liquid nitrogen.
- Put the Cryotop in a cane and store it in a storage tank.

**Quality Control Specification**

Each lot of Vitrification Media receives the following tests:

- Sterility by the current USP Sterility Test <71> (Solutions)
- Endotoxin by LAL methodology
- Mouse Embryo Assay (One Cell)
- pH (Ph.Eur., USP)
- Osmolality (Ph.Eur., USP)

**Storage instructions and stability**

- Solutions: Store the vials at 2-8 °C
- The product is stable until the expiry date shown on the vial label.

**Composition**

- HEPES within Basic Culture Medium
- Ethylene Glycol
- Dimethyl Sulfoxide
- Trehalose
- Hydroxypropyl Cellulose

**Warning**

- Do not re-sterilize
- Do not use solution that shows cloudiness or has turned yellow.
- Do not use if sterile packaging is broken.
- Upon delivery media must be stored in original unopened container and refrigerated at 2-8 °C.
- To avoid contamination, do not reuse.

**Cautions**

- Read the instructions for use prior to use.
- This product is intended to be used by medical specialists trained in fertility treatment.
- Aseptic technique should be used.
- Use sterilized equipment and materials only.
- Decontaminate the workstation.
- Follow procedures in an environmentally controlled room.
- The long term safety is unknown.

**IT: Uso**

- Terreni di Vitrificazione viene utilizzata per la vitrificazione di ovociti ed embrioni umani.
- ATTENZIONE:** Il prodotto è sterile se la confezione è chiusa e non danneggiata. Non utilizzarlo se la confezione è danneggiata.

**Terreni di Vitrificazione**

- N.0 Soluzione Base (BS): 1 fiala da 1,5 ml (solo per la Vitrificazione degli Ovociti)
- N.1 Soluzione di Equilibramento (ES): 1 fiala da 1,5 ml
- N.2 Soluzione di Vitrificazione (VS): 2 fiale da 1,5 ml

**Accessori raccomandati**

- Cryotop: consigliamo di utilizzare un Cryotop per la conservazione fino ad un massimo di 4 ovociti o di 4 embrioni
- Reproplate: piastre con 6 pozetti

**Istruzioni per l'uso**

- Preparazione**
- Versare azoto liquido in un serbatoio, riempiendolo fino al 90%.
  - Confrontare la larghezza dello spazio perivitellino e lo spessore della zona pellucida. Prendere nota di questa misura.
- NOTA:** usare una pipetta Pasteur che presenti un diametro interno adeguato ad aspirare ovociti (diametro esterno: 120 µ) o embrioni.

- ATTENZIONE:** per equilibrare gli ovociti e gli embrioni si ricorre a procedure diverse.

**Procedura per equilibrare gli ovociti**

- Servendosi di una micropipetta, trasferire, sotto forma di gocce, 20 µl di BS e 300 µl di VS1 e di VS2 sul Repro Plate.
- Spostare l'ovocita dal piatto di coltura al FONDO della BS.
- Passo 1. Aggiungere delicatamente 20 µl di ES sulla parte SUPERIORE della BS. Lasciare agire per 3 minuti.
- Passo 2. Aggiungere delicatamente altri 20 µl di ES sulla parte SUPERIORE della BS. Lasciare agire per 3 minuti.
- Passo 3. Aggiungere delicatamente altri 240 µl di ES sulla parte SUPERIORE della BS. Lasciare agire per 9 minuti.

**Procedura per equilibrare gli embrioni**

- Servendosi di una micropipetta, trasferire, sotto forma di gocce, 300 µl di ES, di VS1 e di VS2 sul Repro Plate.
- Spostare l'embrione sulla parte SUPERIORE centrale della ES.
- L'embrione, automaticamente, comincia a restringersi e, poi, gradualmente (in ca. 15 minuti), riassume le dimensioni originali grazie all'infiltrazione di ES.

**Vitrificazione**

- ATTENZIONE:** eseguire i passi seguenti, dal 4 al 9, in un periodo di tempo compreso tra 60 e 90 secondi.
- Servendosi della pipetta Pasteur, aspirare l'ovocito (embrione) dalla ES e spolarlo nella parte SUPERIORE centrale della VS1.
- Servendosi della pipetta Pasteur, aspirare l'ovocito (embrione) e rimuoverlo. Ripetere questa operazione per 3 volte, cambiando la posizione nella VS1.
- Spostare l'ovocito (embrione) alla VS2. Servendosi della pipetta Pasteur, cambiare la posizione dell'ovocito (embrione) nella VS2 per due volte.
- Spostare l'ovocito (embrione) vicino alla parte nera del vetrino del Cryotop. Ottenere una goccia schiacciata.
- Con il microscopio, assicurarsi che l'ovocito (embrione) del vetrino non presenti un volume eccessivo di VS2 (meno di 0,1 µl).
- Immergere rapidamente il Cryotop nell'azoto liquido.
- Inserire il Cryotop in un tubo e conservare in un recipiente ermetico.

**Test di controllo della qualità**

- Ogni lotto di Terreni di Vitrificazione viene sottoposto ai seguenti test.
- Controllo della sterilizzazione mediante il test di sterilità USP (Soluzioni).
- Rilevamento di endotossine mediante il LAL test.
- Analisi su embrione di topo (una cellula) - MEA Test.
- pH (Ph.Eur., USP)
- Osmolarità (Ph.Eur., USP)

**Istruzioni per la conservazione e la stabilità**

- Soluzioni: Conservare le fiale a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.
- Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

**Composizione**

- HEPES in terreno di coltura basico
- Glicol Etilenico
- Dimetil Solfossido
- Trealosio
- Hydroxypropylcellulosa

**Avvertenze**

- Non risterrilizzare.
- Non utilizzare soluzioni che si presentano torbide o di colore giallastro.
- Non utilizzare se la confezione sterile appare danneggiata.
- Conservare i prodotti nella confezione originale, sigillata e non aperta, a una temperatura compresa tra 2°C e gli 8°C.
- Non riutilizzare per evitare ogni rischio di contaminazione.

**Precauzioni**

- Prima dell'uso, leggere attentamente le istruzioni.
- Questo prodotto è stato realizzato per essere utilizzato da personale medico con adeguate conoscenze in trattamenti di fertilità.
- Utilizzare tecniche asettiche.
- Utilizzare apparecchiature, materiali e strumenti sterilizzati.
- Decontaminare l'area di lavoro.
- Operare in locali con condizioni ambientali controllate.
- Non sono disponibili dati sulla sicurezza a lungo termine del prodotto.

**FR: Usage prévu**

- Les milieux de vitrification permettent de vitrifier des ovocytes et des embryons.
- AVERTISSEMENT:** ne pas stériliser si l'emballage est ouvert ou endommagé. Ne pas utiliser si l'emballage est détérioré.

**Milieux de vitrification**

- N°0. Solution de Base (BS): 1 x 1,5 ml (uniquement pour la vitrification ovocytaires).
- N°1. Solution d'équilibration (ES): 1 x 1,5 ml
- N°2. Solution de vitrification (VS): 2 x 1,5 ml

**Matériel requis**

- Cryotop: 1 cryotop contient jusqu'à 4 ovocytes ou 4 embryons suivant les recommandations
- Plaque 6 puits

**Consignes d'utilisation**

- Préparation**
- Remplir à 90 % un réservoir de refroidissement avec de l'azote liquide.
  - Comparer la largeur de l'espace périvitellin avec l'épaisseur de la zone pellucide puis l'enregistrer.
- REMARQUE:** utiliser une pipette Pasteur avec un diamètre interne adapté à l'ovocyte (diamètre externe: 120 µm) ou à l'embryon.

- AVERTISSEMENT:** les procédures d'équilibration pour les ovocytes et les embryons sont différentes.

**Équilibration des ovocytes**

- À l'aide d'une micropipette, déposer 20 µl de BS, 300 µl de VS1 et 300 µl de VS2 sur la plaque 6 puits.
- Transférer l'ovocyte de la boîte de Pétri vers le FOND de la BS.
- Étape 1. Ajouter délicatement 20 µl de ES À LA SURFACE de la BS et la laisser pendant 3 minutes.
- Étape 2. Ajouter à nouveau délicatement 20 µl de ES À LA SURFACE de la BS et la laisser pendant 3 minutes.
- Étape 3. Ajouter à nouveau délicatement 240 µl de ES À LA SURFACE de la BS et la laisser pendant 9 minutes.

**Équilibration de l'embryon**

- À l'aide d'une micropipette, déposer 300 µl pour ES, VS1 et VS2 sur la plaque 6 puits.
- Transférer l'embryon SUR LA SURFACE au centre de la ES.
- Il va commencer à rétrécir spontanément puis reviendra progressivement à sa taille normale par infiltration de la ES (pendant 15 minutes).

**Vitrification**

- AVERTISSEMENT:** les étapes suivantes de 4 à 9 doivent être réalisées entre 60 et 90 secondes.
- Aspirer l'ovocyte (embryon) situé dans la ES avec l'embout de la pipette Pasteur. Transférer l'ovocyte (embryon) sur LA SURFACE au centre de la VS1.
- Aspirer l'ovocyte (embryon) à l'aide d'une pipette Pasteur puis la rejeter. Répéter cette étape 3 fois en changeant la position dans la VS1.
- Transférer l'ovocyte (embryon) dans la VS2. Bouger l'ovocyte (embryon) en changeant de positions deux fois dans la VS2 avec la pipette Pasteur.
- Vérifier l'ovocyte (embryon) à côté de la partie noire de la lame du Cryotop. Réaliser une gouttelette plane.
- Placer que l'ovocyte (embryon) se trouve sur la lame avec une quantité minimale de VS2 (moins de 0,1 µl) sous le microscope.
- Plonger rapidement le Cryotop dans l'azote liquide.
- Introduire le Cryotop dans un visotube et le conserver dans un réservoir de stockage.

**Tests de contrôle qualité**

- Les tests suivants ont été réalisés sur chaque lot de milieu de vitrification:
- Test de stérilité de la pharmacopée américaine (USP) (Solutions)
- Endotoxines: méthode LAL
- Tests sur embryons de souris (une cellule)
- pH (Ph.Eur., USP)
- Osmolarité (Ph.Eur., USP)

**Conditions de conservation et stabilité**

- Stocker les solutions à 2-8 °C.
- Le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

**Composition**

- HEPES dans un milieu de culture de base
- Trehalose
- Hydroxypropylcellulose

**Mise en garde**

- Ne pas restériliser.
- Ne pas utiliser une solution trouble ou ayant viré au jaune.
- Ne pas utiliser si l'emballage stérile est détérioré.
- Les milieux doivent être conservés dans leur récipient original non ouvert, réfrigérés entre 2 et 8 °C.
- Afin d'éviter toute contamination, ne pas réutiliser.

**Avvertissements**

- Lire les instructions avant utilisation.
- Ce produit est destiné à être utilisé uniquement par un personnel spécialisé dans le traitement de la fertilité.
- Une technique aseptique doit être utilisée.
- Utiliser des instruments, matériel et objets stérilisés.
- Décontaminer la salle de travail.
- Suivre les procédures dans une pièce à l'atmosphère contrôlée.
- La sécurité à long terme est inconnue.

**DE: Anwendungszweck**

- Die Vitrifikationsmedien sind für die Vitrifizierung von menschlichen Oozyten und Embryonen bestimmt.
- VORSICHT:** Nur steril, solange die Verpackung nicht geöffnet oder beschädigt wurde. Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden.

**Vitrifikationsmedien**

- Nr.0 Basislösung (BS): 1 x 1,5 ml Ampulle (nur zur Vitrifizierung von Oozyten)
- Nr.1 Equilibrationslösung (ES): 1 x 1,5 ml Ampulle
- Nr.2 Vitrifikationslösung (VS): 2 x 1,5 ml Ampullen

**Empfohlenes Zubehör**

- Cryotop: 1 Cryotop kann mit bis zu 4 Oozyten oder 4 Embryos beladen werden (Empfehlung).
- Repro Plate: Mit 6 Vertiefungen

**Anwendungshinweise**

- Vorbereitung**
- Füllen Sie 90% der Kryowanne (Cooling Rack) mit frischem Flüssigstickstoff.
  - Vergleichen Sie die Breite des perivitellinen Raums mit der Dicke der Zona pellucida und protokollieren Sie das Ergebnis.

**HINWEIS:** Verwenden Sie hierzu eine Pasteur-Pipette mit geeignetem Innendurchmesser für Eizellen (Außendurchmesser: 120µm) oder Embryonen.

- VORSICHT:** Die Equilibrationsverfahren sind für Eizellen und Embryonen unterschiedlich.

**Eizellen-Equilibration**

- Füllen Sie 20µl der BS und jeweils 300µl der VS1 und VS2 mit einer Mikro-Pipette in die Repro-Platte.
- Übertragen Sie die Eizelle aus der Kulturschale auf den BODEN der BS.
- Schritt 1: Geben Sie vorsichtig 20µl der ES auf die OBERFLÄCHE der BS und lassen Sie sie dort 3 Minuten wirken.
- Schritt 2: Geben Sie vorsichtig weitere 20µl ES auf die OBERFLÄCHE der BS und lassen Sie sie ebenfalls 3 Minuten wirken.
- Schritt 3: Geben Sie zusätzliche 240µl der ES auf die OBERFLÄCHE der BS und lassen Sie 9 Minuten wirken.

**Embryonen-Equilibration**

- Geben Sie jeweils 300µl der ES sowie der VS1 und VS2 mit einer Mikro-Pipette in die Repro-Platte.
- Übertragen Sie den Embryo und platzieren Sie ihn in der Mitte der Oberfläche der BS.
- Es schrumpft spontan zusammen und kehrt sukzessive zu seiner ursprüngliche Größe, durch das Eindringen der ES, zurück (innerhalb von 15 Minuten).

**Vitrifizierung**

- VORSICHT:** Die folgenden Schritte 4 - 9 müssen innerhalb eines Zeitraums von 60 - 90 Sekunden ausgeführt werden.
- Saugen Sie die Eizelle (den Embryo) aus der ES mit der Spitze einer Pasteur-Pipette an. Übertragen Sie nun die Eizelle (den Embryo) und platzieren Sie sie/ihn in der Mitte der Oberfläche der VS1.
- Saugen Sie die Eizelle (den Embryo) mit der Pasteur-Pipette an und blasen Sie sie (oder ihn) dann wieder aus, wobei Sie ihre/seine Position in der VS1 jeweils verändern müssen. Dieser Vorgang muss 3 x wiederholt werden.
- Übertragen Sie die Eizelle (den Embryo) in die VS2. Bewegen Sie die Eizelle (den Embryo) mithilfe der Pasteur-Pipette in der VS2 und verändern Sie dabei ihre/seine Position insgesamt zweimal.
- Platzieren Sie die Eizelle (den Embryo) in einem flachen Tröpfchen auf dem schwarzen Teil des Cryotop-Blattes.
- Überprüfen Sie unter dem Mikroskop, ob die Eizelle (der Embryo) auf dem Blatt nur mit einem minimalen Volumen der VS2 (unter 0,1µl) behaftet ist.
- Tauchen Sie das Cryotop zügig in Flüssigstickstoff ein.
- Legen Sie das Cryotop in ein Röhrchen und bewahren Sie es in einem Speichertank auf.

**Qualitätskontrolle**

- Jede Charge der Vitrifikationsmedien wird mit folgenden Tests überprüft:
- Überprüfung der aktuellen USP Sterilitätstests (Lösungen)
- Endotoxin durch die LAL-Methode
- MEA (Mouse Embryo Assay) (Eine Zelle)
- pH (Ph.Eur., USP)
- Osmolarität (Ph.Eur., USP)

**Anweisungshinweise und Haltbarkeit**

- Lagern Sie die Ampullen bei einer Temperatur zwischen 2 und 8 °C.
- Das Produkt ist bis zum (auf dem Ampullenetikett angegebenen) Verfallsdatum stabil.

**Zusammensetzung**

- HEPES gepuffertes Basismedium
- Ethylenglykol
- Dimethylsulfoxid
- Trehalose
- Hydroxypropylcellulose

**Warnhinweise**

- Keine erneute Sterilisierung durchführen.
- Verwenden Sie keine Lösungen, die eine Trübung zeigen oder gelb geworden sind.
- Nicht verwenden, wenn die sterile Verpackung beschädigt ist.
- Das jeweilige Medium muss bei einer Temperatur von 2-8 °C im ungeöffneten Originalbehälter gekühlt aufbewahrt werden.
- Nicht mehrmals verwenden, um Kontaminationen zu vermeiden.

**Vorsichtsmaßnahmen**

- Lesen Sie vor Gebrauch die Anwendungshinweise.
- Dieses Produkt ist nur zur Anwendung durch medizinische Fachkräfte gedacht, die auf Fruchtbarkeitsbehandlungen spezialisiert sind.
- Stets aseptische Verfahren anwenden.
- Verwenden Sie nur sterilisierte Geräte, Materialien und Hilfsmittel.
- Dekontaminieren Sie den Arbeitsbereich.
- Führen Sie das Verfahren in einem Raum durch, dessen Umgebung gesteuert und kontrolliert werden kann.
- Die langfristige Sicherheit ist bisher nicht bekannt.

**References**

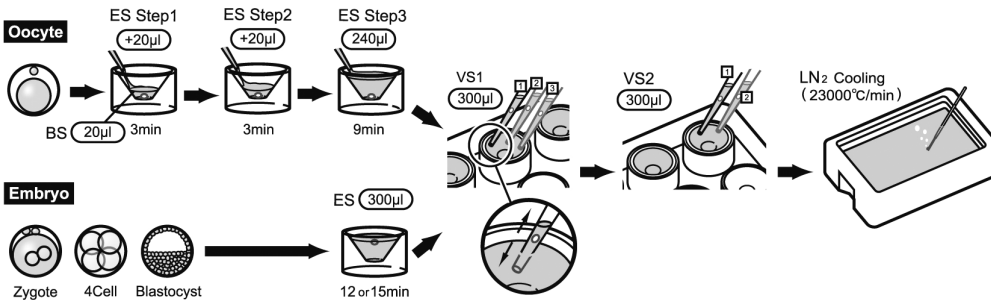
- Cobo A., Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. Fertility and Sterility, 2014.
- Rienzi L., Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. Human Reproduction, 2012.
- Shi W., Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers. Fertility and Sterility, 2012.
- Cobo A., Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. Fertility and Sterility, 2012.
- Trokudes KM., Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. Fertility & Sterility, 2011.
- Inoue F., Hydroxypropyl cellulose as a macromolecular supplement for cryopreservation by vitrification of bovine oocytes and blastocysts and human oocytes. ESHRE and ASRM, 2011.



# Vitrification Cryotop Method for Oocyte and Embryo Vitrification Media

CE 0086

## Code:VT801



STERILE A	Sterilized Using Aseptic Processing Techniques
STERILE R	Sterilized Using Irradiation
Do not reuse	
REF	Catalog Number
LOT	Batch Code
Use by	
Storage Temperature	
CE 0086	CE mark
Manufacturer	
Do not resterilize	
Do not use if package is damaged	
Consult Instructions for use	

### PT: Uso pretendido

Os meios de vitrificação servem para vitrificar Ovócitos e Embriões.  
**ATENÇÃO:** Estéril, se a embalagem permanecer fechada ou intacta. Não utilize se a embalagem estiver deteriorada.

### Processos de Vitrificação

№ 0. Solução Básica (BS): 1 frasco de 1,5ml (somente para vitrificação de Ovócitos)  
№ 1. Solução de Equilíbrio (ES): 1 frasco x 1,5ml  
№ 2. Solução de vitrificação (VS): 2 frasco x 1,5ml

### Material recomendado

Cryotop: 1 Cryotop que armazena até 4 Ovócitos ou 4 Embriões, segundo recomendação.  
Placas reproplate: com 6 poços

### Instruções de Uso

**Preparação**  
Preencher até 90% o utensílio de arrefecimento com azoto líquido fresco. Compare a largura do espaço perivitelino com a espessura da zona pelúcida e anote esse dado.

**NOTA:** Usar uma pipeta Pasteur com um diâmetro interior adequado para o ovócito (diâmetro exterior 120µm) ou embrião.

### EQUILIBRAMENTO

**ATENÇÃO!** Os procedimentos de equilíbrio para Ovócitos e Embriões são diferentes.

### Equilíbrio de Ovócitos.

- Verta 20µl para BS e 300µl para VS1 e VS2 no reproplate com uma micropipeta.
  - Transfira o ovócito da placa de cultivo até o FUNDO da BS.
  - Passo 1. Adicione suavemente 20µl de ES na parte SUPERIOR da BS e deixe repousar 3 minutos.
- Passo 2: Adicione suavemente outros 20µl na parte SUPERIOR da BS e deixe repousar 3 minutos.
- Passo 3: Adicione suavemente outros 240µl na parte SUPERIOR da BS e deixe repousar 9 minutos.

### Equilíbrio dos Embriões

- Verte 300µl de ES, VS1 e VS2 no reproplate utilizando uma micropipeta.
- Transfira o embrião para a parte SUPERIOR central da ES.
- O embrião espontaneamente começará a encolher e depois, gradualmente, (em 15 minutos) voltará a seu tamanho original graças a infiltração de ES.

### Vitrificação

- ATENÇÃO!** Os passos seguintes de 4 a 9 devem ser realizados em um período de tempo entre 60 e 90 segundos.
- Aspire o ovócito (embrião) da ES com a ponta da pipeta Pasteur. Levante o ovócito até a parte SUPERIOR central da VS1.
  - Aspire o ovócito (embrião) com uma pipeta Pasteur e expulsa-lo. Repita este passo 3 vezes trocando a posição na VS1.
  - Transferir o ovócito (embrião) para a VS2. Trocar a posição do ovócito (embrião) duas vezes na VS2 utilizando a pipeta Pasteur.
  - Colocar o ovócito (embrião) perto da parte preta da lâmina Cryotop. Faça uma gotícula plana.
  - Comprovar, com o microscópio, se o ovócito (embrião) situado na lâmina apresenta um volume mínimo de VS2 (menos de 0,1µl).
  - Imergir rapidamente o Cryotop no azoto líquido.
  - Colocar o Cryotop em um tubo e armazená-lo em um tanque de armazenamento.

### Provas de Controle de Qualidade

Cada lote dos meios de vitrificação é submetido aos testes seguintes:  
• Esterilização mediante teste de esterilidade USP, teste 71 (Soluções)  
• Detecção de endotoxinas mediante metodologia de LAL.  
• Ensaio com embrião de rato (uma célula).  
• Teste de pH (Ph.Eur., USP)  
• Teste de osmolalidade (Ph.Eur., USP)

### Instruções para Armazenagem e Estabilidade

Armazenar as frascos a 2-8°C.  
O produto é estável até a data de validade indicada na etiqueta do frasco.

### Composição

- HEPES com meio de cultivo
- Etilenoglicol
- Dimetilsulfóxido
- Trealose
- Hidroxipropilcelulosa

### Advertência:

- Não esterilizar novamente.
- Não utilizar uma solução que está turva ou amarelada.
- Não utilizar se a embalagem estiver danificada.
- As soluções devem ser armazenadas em seus recipientes originais, sem abrir e refrigeradas a 2-8°C.
- Para evitar uma possível contaminação, não reutilizar.

### Precauções

- Ler as instruções de utilização antes de usar.
- Este produto deve ser utilizado por médicos especialistas em tratamentos de fertilidade.
- Deve-se aplicar técnicas assépticas.
- Utilizar equipamentos, materiais e instrumental esterilizado.
- Descontaminar a área de trabalho.
- Realizar os processos em uma sala com atmosfera controlada.
- A segurança a longo prazo deste produto é desconhecida.

### PL: Przeznaczenie

• Media do vitrificação służą do mrożenia ludzkich komórek jajowych i zarodków.  
**PRZESTROGA:** Urządzenie zachowuje jawność, jeśli opakowanie nie jest otwarte ani uszkodzone. Nie stosować, jeśli opakowanie zostało naruszone.

### Media do vitrifikasi

№ 0. Roztwór podstawowy (BS): 1 fiołka 1,5 ml (wyłącznie do vitrifikasi komórek jajowych).  
№ 1. Roztwór równowagi (ES): 1 fiołka 1,5 ml  
№ 2. Roztwór vitrifikasi (VS): 2 fiołki 1,5 ml

### Rekomendowane akcesoria

Kriotopy: zaleca się, aby w jednym Kriotopie przechowywane były nie więcej niż 4 komórki jajowe lub 4 zarodki.  
Szalki ReproPlate: 6 dołkami

### Instrukcja użycia

**Przygotowanie**  
• Nacynie chłodzące wypełnić w 90% świeżym ciekłym azotem.  
• Porównać szerokość przestrzni okolożółtkowej z grubością otoczki przejrzystej i zapisać ich stosunek.

**UWAGA:** Należy używać pipety Pasteura o wewnętrznej średnicy odpowiadającej owocytowi (średnica zewnętrzna: 120 µm) lub zarodkowi.

**PRZESTROGA:** Procedury równowagi owocytów i zarodków przebiegają w różny sposób.

### Równowazenie owocytu

- Za pomocą mikropipety nanieść na płytkę Repro Plate 20 µl roztworu BS oraz po 300 µl roztworów VS1 i VS2.
- Przenieść owocyt z szalki do hodowli na DNO warstwy BS.
- Etap 1. Delikatnie nanieść 20 µl ES na WIERZCH warstwy BS i pozostawić na 3 minuty.  
Etap 2. Delikatnie nanieść kolejne 20 µl ES na WIERZCH warstwy BS i pozostawić na 3 minuty.  
Etap 3. Delikatnie nanieść kolejne 240 µl ES na WIERZCH warstwy BS i pozostawić na 9 minut.

### Równowazenie zarodka

- Za pomocą mikropipety nanieść na płytkę Repro Plate po 300 µl roztworów BS, VS1 i VS2.
- Przenieść zarodek na WIERZCH i na środek warstwy ES.
- Zarodek zaczyna się samistnie kurczyć, po czym stopniowo wraca do początkowych rozmiarów na skutek infiltracji ES (w ciągu 15 minut).

### Vitrifikacja

- PRZESTROGA:** Opisane poniżej etapy (od 4 do 9) należy przeprowadzić w czasie od 60 do 90 sekund.
- Zaaspirować owocyt (zarodek) w ES do końcówki pipety Pasteura.
  - Przenieść owocyt (zarodek) na WIERZCH i na środek warstwy VS1.
  - Zaaspirować owocyt (zarodek) do pipety Pasteura, po czym go wyincynić. Powtarzać ten etap 3-krotnie, zmieniając położenie w obrębie VS1.
  - Przenieść owocyt (zarodek) do VS2. Dwukrotnie przenieść owocyt (zarodek) za pomocą pipety Pasteura, zmieniając jego położenie w obrębie VS2.
  - Umieścić owocyt (zarodek) w czarnej części arkusza Cryotopu. Zrobić płaską kropelkę.
  - Sprawić pod mikroskopem, czy owocyt (zarodek) leży na arkuszu w minimalnej objętości VS2 (poniżej 0,1 µl).
  - Szybko zanurzyć Cryotop w ciekłym azocie.
  - Włożyć Cryotop do słomki i przechowywać w pojemniku do przechowywania.

### Kontrola Jakości

Każda seria Mediów do Vitrifikasi poddawana jest następującym testom:  
• Ocena jawności metodą USP (Roztwory)  
• Ocena obecności endotoksin metodą LAL.  
• Test MEA (jednokomórkowy)  
• badanie pH (Ph.Eur., USP)  
• badanie osmolalności (Ph.Eur., USP)

### Zalecenia dotyczące przechowywania oraz stabilności

• Przechowywać folki w temperaturze 2-8°C.  
• Produkt posiada stabilność do wygaśnięcia daty ważności umieszczonej na etykiecie folki.

### Skład

- HEPES w podstawowej pożywce hodowlanej bakterii
- Glikol Etylenowy
- Dimetylofosfotlenek
- Trealoza
- Hydroxypropylceluloza

### Ostrzeżenie

- Nie podawać ponownie sterylizacji.
- Nie używać roztworu, który zmienił lub zmienił kolor na żółty.
- Nie stosować w przypadku uszkodzonego sterylnej opakowania.
- Podłoża muszą być przechowywane w lodówce w oryginalnym, nieotwartym opakowaniu, w temperaturze 2-8°C.
- Nie używać ponownie, aby nie dopuścić do skażenia.

### Przestrogi

- Przed użyciem przeczytać instrukcję użytkowania.
- Niniejszy produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez personel medyczny specjalizujący się w leczeniu niepłodności.
- Należy stosować aseptyczne techniki.
- Stosować jałowe wyposażenie, materiały i produkty.
- Przewodzący dekontaminację pomieszczenia roboczego.
- Wykonywać procedury w pomieszczeniu o kontrolowanych warunkach otoczenia.
- Nie jest znane długoterminowe bezpieczeństwo.

### RU: Назначение

• Растворы для витрификации предназначены для замораживания яйлекеток и эмбрионов.  
**ВНИМАНИЕ:** Стерильно, если упаковка не вскрыта или не повреждена. Не использовать в случае нарушения целостности упаковки

### Растворы для витрификации

№ 0. Базовый раствор (BS): одна ампула 1,5 мл (только для витрификации яйлекеток)  
№ 1. Выравнивающий раствор (ES): одна ампула 1,5 мл  
№ 2. Раствор для витрификации (VS): две ампулы по 1,5 мл

### Рекомендуемые приспособления:

Криотоп: с 1 Криотоп помещается до 4 яйлекеток или 4 эмбрионов.  
Репродуктивная пластина Repro Plate: с 6 ячейками

### Инструкции к применению

**Подготовка**  
• Заполните охлаждающее основание свежим жидким азотом на 90%.  
• Сравните ширину перивителлинового пространства с толщиной прозрачной зоны и запишите показание.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** использовать пастеровскую пилетку с подходящим внутренним диаметром для овциота (внешний диаметр 120 мкм) или эмбриона.

**ВНИМАНИЕ:** процедуры выравнивания для овциотов и эмбрионов отличаются.

### Уравнивание овциотов

- Поместите 20 мкл BS и по 300 мкл VS1 и VS2 на репродуктивную пластину Repro Plate с помощью микропипетки.
- Перенесите овцит из чашки с культурой на ДНО BS.
- Шаг 1. Аккуратно добавьте 20 мкл ES на ПОВЕРХНОСТЬ BS и оставьте на три минуты.  
Шаг 2. Аккуратно добавьте еще 20 мкл ES на ПОВЕРХНОСТЬ BS и оставьте на три минуты.  
Шаг 3. Аккуратно добавьте еще 240 мкл ES на ПОВЕРХНОСТЬ BS и оставьте на девять минут.

### Уравнивание эмбрионов

- Поместите 300 мкл ES, VS1 и VS2 на репродуктивную пластину Repro Plate с помощью микропипетки.
- Перенесите эмбрион в центр ПОВЕРХНОСТИ ES.
- Он начнет уменьшаться, а потом постепенно возвращается к исходному размеру благодаря проникновению ES (в течение 15 минут).

### Витрификация

- ВНИМАНИЕ:** шаги 4-9 необходимо выполнить за 60-90 секунд.
- Захватите овцит (эмбрион) в ES на кончике пастеровской пилетки.
  - Перенесите овцит (эмбрион) в центр ПОВЕРХНОСТИ VS1.
  - Захватите овцит (эмбрион) пастеровской пилеткой и выдуйте его. Повторите это действие три раза, меняя положение в VS1.
  - Перенесите овцит (эмбрион) в VS2. Перенесите овцит (эмбрион), дважды меняя положение в VS2 с помощью пастеровской пилетки.
  - Поместите овцит (эмбрион) возле черной части листа Cryotop. Сделайте плоскую каплю.
  - С помощью микрола увидев, что овцит (эмбрион) находится на листе с минимальным объемом VS2 (менее 0,1 мкл).
  - Быстро окуните Cryotop в жидкий азот.
  - Положите Cryotop в форму и держите его в емкости для хранения

### Контроль качества

Каждый лот растворов для витрификации проходит следующие проверки:  
• Проверка стерильности с помощью теста USP (Растворы)  
• Проверка на эндотоксины с помощью метода лизата амёбциетов Limulus  
• Проверка мышинным эмбрионом (одна клетка) – MEA Test  
• Тестирование pH (Ph.Eur., USP)  
• Тестирование осмолальности (Ph.Eur., USP)

### Условия хранения и стабильность

• Хранить ампулы при температуре 2-8°C.  
• Растворы можно хранить до даты, указанной на этикетке.

### Состав

- HEPES в составе базовой среды для культуры
- Этилен Гликоль
- Диметилсульфоксид
- Трегалоза
- Гидроксипропилцеллюлоза

### Осторожно

- Не стерилизовать повторно.
- Не использовать поумнеший или пожелтевший раствор.
- Не использовать при нарушении целостности стерильной упаковки.
- Хранить растворы в холодильнике в оригинальной закрытой упаковке при температуре 2-8°C.
- Во избежание заражения не использовать повторно.

### Меры предосторожности

- Прочитайте инструкции перед использованием.
- Данный продукт предназначен для использования только специалистами репродуктивной медицины.
- Применяйте асептические методы.
- Используйте стерилизованное оборудование, материалы и предметы.
- Проведите обеззараживание рабочего помещения.
- Выполняйте процедуры в помещении с климат-контролем.
- Данных по безопасности в долгосрочной перспективе нет.

### ES: Uso previsto

• Los Medios de Vitrificación sirven para la Vitrificación de ovocitos y embriones.  
**PRECAUCIÓN:** El producto se mantendrá estéril si el envase no está abierto y no ha sufrido ningún daño. No lo utilice si el envase está roto.

### Medios de Vitrificación

№ 0. Solución Básica (BS): 1 vial X 1,5 ml (Solo para la Vitrificación de Ovocitos).  
№ 1. Solución de Equilibrado (ES): 1 vial X 1,5 ml  
№ 2. Solución de Vitrificación (VS): 2 vial X 1,5 ml

### Equipamiento recomendado

Cryotop: 1 Cryotop puede almacenar hasta 4 Ovocitos o 4 Embriones, de acuerdo con la recomendación  
Repro plates con 6 pocillos

### Instrucciones de uso

**Preparación**  
• Llenar hasta un 90% una gradilla con nitrógeno líquido para su refrigeración.

**NOTA:** usar una pipeta Pasteur que tenga un diámetro interior adecuado para ovocitos (diámetro exterior: 120 µm) o embriones.

**ATENCIÓN:** los procedimientos de equilibrio para los ovocitos y los embriones son diferentes.

### Equilibrado de los ovocitos

- Dejar caer en forma de gota 20 µl de BS y 300 µl tanto de VS1 como de VS2 en el Repro Plate utilizado para ello una micropipeta.
- Transferir el ovocito del plato de cultivo al FONDO de la BS.
- Passo 1. Añadir suavemente 20 µl de ES a la parte SUPERIOR de la BS y dejar reposar 3 minutos.  
Passo 2. Añadir suavemente 20 µl de ES a la parte SUPERIOR de la BS y dejar reposar 3 minutos.  
Passo 3. Añadir suavemente 240 µl de ES a la parte SUPERIOR de la BS y dejar reposar 9 minutos.

### Equilibrado de los embriones

- Dejar caer en forma de gota 300 µl de ES, de VS1 y de VS2 en el Repro Plate utilizado para ello una micropipeta.
- Transferir el embrión a la parte SUPERIOR central de la ES.
- El embrión, espontáneamente, comenzará a encogerse y, después, gradualmente (en 15 minutos), volverá a recuperar su tamaño original gracias a la infiltración de ES.

### Vitrificación

- ATENCIÓN:** los siguientes pasos, del 4 al 9, deberían completarse en un periodo de tiempo de entre 60 y 90 segundos.
- Aspirar el ovocito (embrión) de la ES con la punta de la pipeta Pasteur. Transferir el ovocito (embrión) a la parte SUPERIOR central de la VS1.
  - Aspirar el ovocito (embrión) con una pipeta Pasteur y expulsarlo. Repetir esta operación 3 veces cambiando la posición en la VS1.
  - Transferir el ovocito (embrión) a la VS2. Cambiar la posición del ovocito (embrión) dos veces en la VS2 utilizando para ello la pipeta Pasteur.
  - Colocar el ovocito (embrión) cerca de la parte negra de la lámina Cryotop. Realizar una gota plana.
  - Comprobar, con el microscopio, que el ovocito (embrión) en la lámina presenta un volumen mínimo de VS2 (menos de 0,1 µl).
  - Sumergir rápidamente el Cryotop en nitrógeno líquido.
  - Poner el Cryotop en un tubo y guardarlo en un tanque de almacenamiento.

### Pruebas de control de calidad

Cada lote de los Medios de Vitrificación se somete a las siguientes pruebas:  
• Control de la esterilización mediante la prueba de esterilidad USP (Soluciones).  
• Detecção de endotoxinas mediante la metodología LAL.  
• Ensayo con embrión de ratón (una célula) – MEA Test.  
• Test de pH (Ph.Eur., USP)  
• Test de Osmolalidad (Ph.Eur., USP)

### Instrucciones de almacenamiento y estabilidad

• Almacenar los viales a 2-8°C.  
• El producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

### Composición

- Medio base tamponado con HEPES
- Etilen Glicol
- Dimetil Sulfóxido
- Trealoza
- Hidroxipropilcelulosa

### Advertencia

- No volver a esterilizar.
- No utilizar una solución que esté turbia o amarillenta.
- No utilizar si el envoltorio está deteriorado.
- Los medios se deben almacenar en sus recipientes originales, sin abrir y refrigerados a 2-8°C.
- Para evitar una posible contaminación, no reutilizar.

### Precauciones

- Leer las instrucciones de uso antes de utilizar.
- Este producto está realizado para su uso por parte de personal médico especialmente en tratamientos de fertilidad.
- Se deberán usar técnicas asépticas.
- Utilizar equipos, materiales e instrumental esterilizado.
- Descontaminar el área de trabajo.
- Realizar los procedimientos en una sala con atmósfera controlada.
- Se desconoce la seguridad del producto a largo plazo.

**KITAZATO**



KITAZATO BioPharma Co., Ltd.  
81 Nakajima, Fuji, Shizuoka 416-0907 Japan TEL: +81-545-66-2202 FAX: +81-545-60-5772



Dibemed-Biomedical Supply, S.L. (5905-PS)  
Copyright©KITAZATO CORPORATION All Rights Reserved.

Copyright © KITAZATO CORPORATION All Rights Reserved.