

Caratteristiche prestazionali di MINC+[®] Benchtop Incubator

Introduzione

L'incubatore per coltura embrionale è senza dubbio la più importante apparecchiatura del laboratorio.¹ Gli incubatori per coltura embrionale devono fornire un ambiente interno stabile per stabilizzare le variabili di coltura come il pH e la temperatura. Inoltre, un incubatore ideale riporta rapidamente le condizioni interne ai valori di equilibrio dopo un evento di disturbo, come l'apertura dello sportello per recuperare una piastra di coltura. Questi fattori sono essenziali da considerare quando si determina l'incubatore specifico da utilizzare per la coltura dell'embrione umano.

Più di 20 anni fa, Cook Medical ha introdotto il primo incubatore per colture embrionali da tavolo, il MINC® (Mini Incubator). Le sue caratteristiche di progettazione erano rivoluzionarie all'epoca e includevano una piccola camera interna, il riscaldamento diretto della piastra e l'umidificazione attiva tramite gas forzato attraverso un recipiente di umidificazione. Queste caratteristiche di progettazione hanno consentito al sistema di raggiungere i parametri ideali sopra descritti. Da quel momento, il MINC è diventato lo strumento standard con cui altri incubatori da tavolo devono confrontarsi.

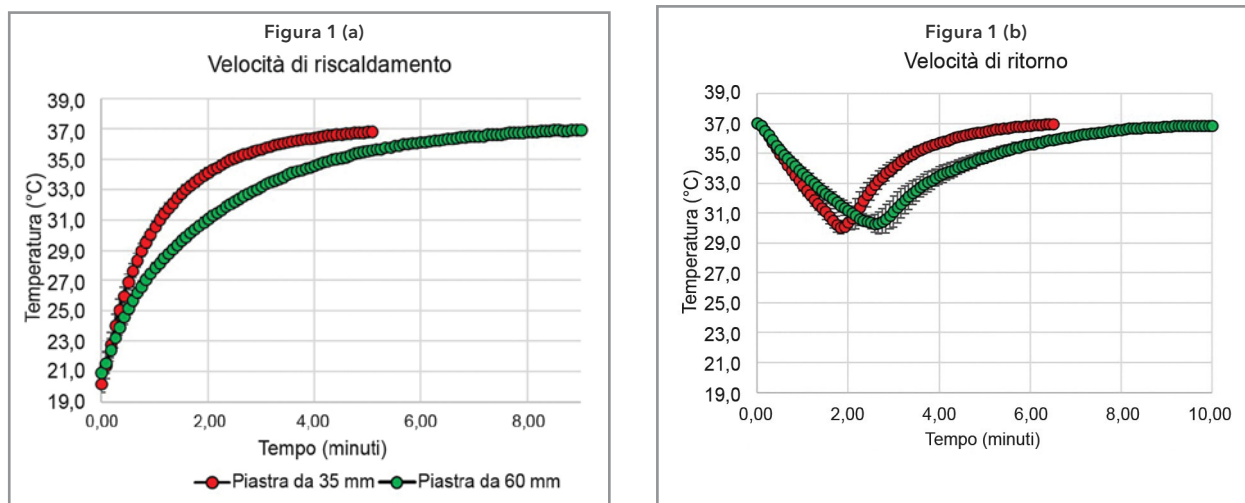
A partire dal 2022, i laboratori di coltura embrionale potranno dotarsi di un incubatore rinnovato che mantiene tutti i vantaggi del MINC originale, con l'inclusione di molti miglioramenti: il MINC+. Di seguito sono descritte in dettaglio diverse caratteristiche prestazionali importanti, con relative discussioni sul motivo per cui riteniamo che il MINC+ sia il migliore incubatore disponibile per la fecondazione in vitro.

Dinamica della temperatura: equilibrio iniziale ed effetti dell'apertura del coperchio

Poiché la stabilità della coltura è fondamentale per l'efficacia della fecondazione in vitro, sorgono domande importanti quando si valutano gli incubatori: **quando le piastre per la coltura embrionale vengono preparate e poste all'interno dell'incubatore, quanto tempo impiega il terreno per raggiungere l'equilibrio? In che modo la rimozione di una piastra dall'incubatore a temperatura ambiente per le osservazioni di routine influisce sulla temperatura del terreno di coltura? Quanto tempo impiega la temperatura a tornare ai valori di equilibrio una volta che la piastra viene riposta nell'incubatore?** Sono stati condotti esperimenti per rispondere a queste domande e i risultati sono presentati di seguito.

Parte 1: riscaldamento di una piastra con terreno e olio dalla temperatura ambiente a 37 °C quando inizialmente inserita nell'incubatore.

Questo studio è stato progettato per valutare il tempo necessario affinché una piastra con terreno e olio raggiunga il setpoint del MINC+ (37,0 °C) quando i componenti sono inizialmente a temperatura ambiente (20-21 °C) e vengono quindi collocati all'interno della camera dell'incubatore. La Figura 1. mostra la dinamica di questo cambiamento di temperatura in gocce medie da 30 µL con uno strato di copertura oleoso da 3 mm in piastre da 35 e 60 mm.



La Figura 1. mostra la dinamica della temperatura di una goccia di terreno di 30 µL con uno strato di copertura oleoso in una piastra da 35 o 60 mm partendo dalla temperatura ambiente (20-21 °C) e spostata nel MINC+ quando il setpoint del MINC+ è 37,0 °C (a). I dati mostrano che la temperatura aumenta rapidamente e si avvicina all'equilibrio (~ 37 °C) in modo asintotico. Rimuovendo la piastra in un luogo a temperatura ambiente per 2-2,5 minuti, la temperatura scende di circa 7 °C (b) e poi, dopo avere riposizionato la piastra nella camera dell'incubatore, la temperatura supera i 36 °C, in media, entro 2,5 minuti (piastra da 35 mm) o 4 minuti (piastra da 60 mm) e raggiunge i 37 °C in circa 4 minuti (piastra da 35 mm) e 7 minuti (piastra da 60 mm). Una termocoppia di tipo T da 40 Ga è stata posizionata nella goccia di terreno durante tutte le letture. La termocoppia è stata acquistata da Omega Engineering (Norwalk, CT USA) e convalidata con un termistore di precisione Fluke 5610-6-P. La registrazione della temperatura è stata effettuata con un datalogger a 12 canali per termocoppie Extech Instruments TM500 (Nashua NH USA). I dati sulla temperatura sono stati acquisiti una volta ogni 5 secondi. Sono indicati gli intervalli di confidenza medi ±95%.

Parte 2: riduzione della temperatura all'apertura del coperchio quando una piastra rimane sulla superficie calda dell'incubatore.

La Figura 2 mostra la riduzione della temperatura delle microgocce in una piastra da 35 mm preparata come descritto in precedenza, quando il coperchio del MINC+ resta aperto per periodi di tempo variabili, con la piastra che resta all'interno dell'incubatore. Per la piastra da 35 mm (2a), quando il coperchio dell'incubatore viene tenuto aperto per 5 secondi, la temperatura scende di circa 0,1 °C. Anche una durata di 25 secondi provoca una riduzione minima di temperatura, con un calo di soli 0,1-0,2 °C. La riduzione di temperatura è simile per una goccia in una piastra da 60 mm con un calo di temperatura tra 0,0 e 0,2 °C fino a 25 secondi.

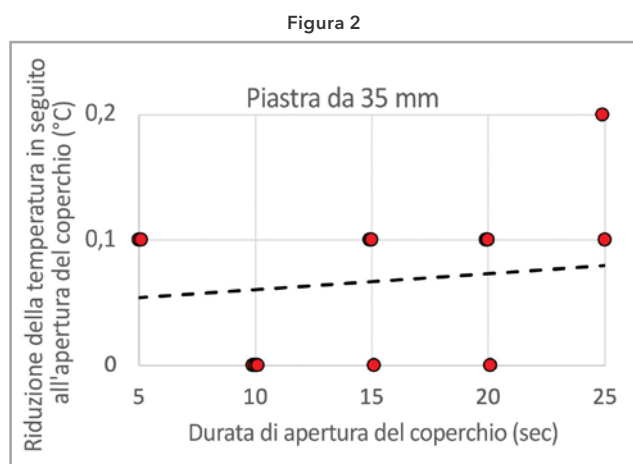


Figura 2. Il grafico mostra la relazione tra la riduzione della temperatura di una goccia di terreno di coltura in una piastra da 35 mm quando il coperchio del MINC+ viene tenuto aperto per periodi di tempo variabili, con la piastra che rimane all'interno dell'incubatore. Una leggera dipendenza della diminuzione della temperatura in funzione del tempo è stata osservata con l'analisi di regressione (linee tratteggiate). Le misurazioni della temperatura sono state ottenute come descritto nella legenda della Figura 1 e raccolte alla velocità di una lettura al secondo. Molti dei punti dati avevano valori identici (ad esempio, tutti e 3 i punti a 10 secondi avevano un valore di 0 °C). Per distinguere i punti, alcuni dei valori temporali sono stati sfalsati di 0,1 °C per mostrare più punti in una regione del grafico.

Gasdinamica: recupero della concentrazione di CO₂ alla chiusura del coperchio

Quanto velocemente si recupera la concentrazione di gas all'interno dell'incubatore dopo l'apertura e la chiusura del coperchio?

La Figura 3. mostra la concentrazione di CO₂ misurata all'interno dell'incubatore dopo l'apertura e la chiusura del coperchio. Le misurazioni sono state effettuate in 6 diverse posizioni all'interno dell'incubatore. Vengono presentati la media e l'errore standard delle 6 misurazioni. La concentrazione si avvicina all'equilibrio (6,43%) asintoticamente ed è maggiore del 95% di tale valore di 3 minuti.

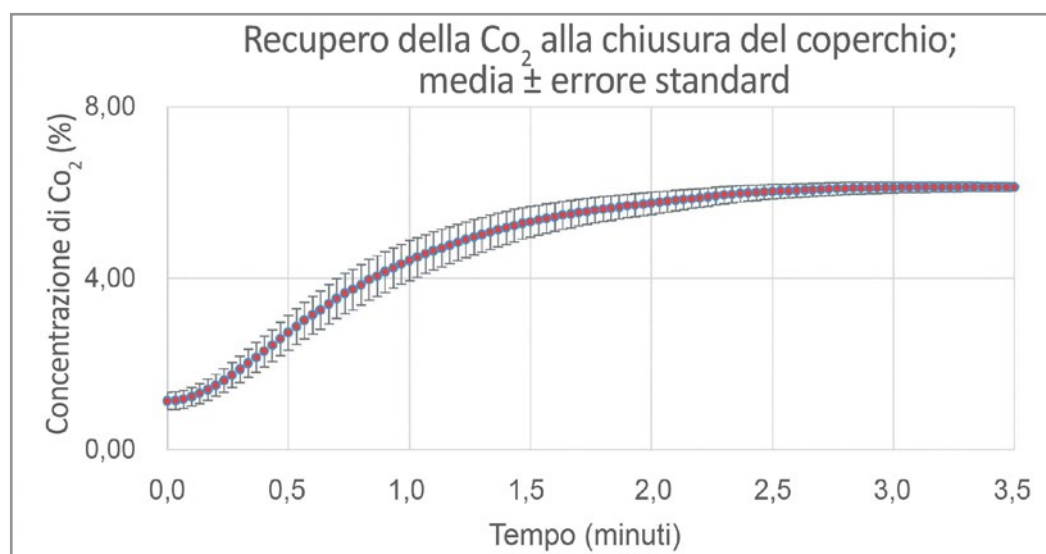


Figura 3. Viene mostrata la dinamica della concentrazione di CO₂ all'interno della camera del MINC+ dopo l'apertura e la chiusura del coperchio. I dati rappresentano la media ± l'errore standard a intervalli di 2 secondi. Le concentrazioni di anidride carbonica sono state misurate utilizzando un sensore calibrato K30 10% CO₂ e il software Gaslab di CO2meter.com a intervalli di 2 secondi. La concentrazione di CO₂ della sorgente di gas è stata misurata al 6,43% ed è utilizzata nel nostro laboratorio per mantenere il pH del terreno di coltura a un livello desiderato (vedere riferimento 3 per una discussione approfondita sul pH nella coltura embrionale).

Discussione

Abbiamo fornito qui una panoramica di alcune delle caratteristiche prestazionali del nuovo MINC+ Benchtop Incubator di Cook Medical. Cook ha una lunga storia nel campo della fecondazione clinica in vitro e considera molto importante la coerenza in termini di qualità. Il MINC+ è stato progettato per fornire lo stesso livello di stabilità e prestazioni dell'incubatore da tavolo originale, il MINC, ma con caratteristiche e vantaggi aggiuntivi.

In genere si ritiene importante mantenere un ambiente controllato per la coltura di embrioni umani, allo scopo di ottenere risultati ottimali.^{1,2} Sono inclusi parametri come la temperatura, il pH dei terreni di coltura e l'osmolalità. Pertanto, la scelta dell'incubatore di coltura embrionale è fondamentale per la creazione di un sistema di coltura embrionale eccellente.

Qui descriviamo i risultati di studi progettati per valutare le caratteristiche prestazionali del nuovo MINC+ Benchtop Incubator di Cook Medical.

Nel primo studio, abbiamo valutato il tasso di variazione della temperatura dalla temperatura ambiente a 37 °C, e anche da 30 a 37 °C, quest'ultimo associato alla rimozione delle piastre dall'incubatore per 2-2,5 minuti, come si farebbe per effettuare un controllo della fecondazione e dello sviluppo embrionale. Il tempo necessario per tornare all'equilibrio termico dopo l'apertura del coperchio è simile a quello valutato in precedenza con l'incubatore MINC originale.^{4,5} Questi risultati non sono sorprendenti, considerando che nell'incubatore MINC+ viene utilizzato lo stesso sistema di riscaldamento impiegato nell'incubatore MINC originale.

Il secondo studio è stato progettato per valutare la riduzione di temperatura di una goccia di terreno di coltura in una piastra quando la piastra rimane sulla superficie dell'incubatore, nel momento in cui il coperchio viene aperto per il tempo previsto necessario a recuperare una piastra dall'incubatore (come determinato durante questo studio e anche da altri).⁵ Considerando il metodo molto efficace di mantenimento della temperatura negli incubatori MINC, è stato rilevato solo un effetto molto ridotto dell'apertura dei coperchi sulla temperatura della goccia. In una piastra da 35 mm, la temperatura è diminuita solo di 0,1-0,2 °C per durate di apertura del coperchio comprese tra 5 e 25 secondi. Nello studio che analizzava lo stesso effetto in una piastra da 60 mm, la riduzione di temperatura era la stessa rispetto alla piastra da 35 mm (0,2 °C).

La temperatura è un parametro importante in un sistema di coltura embrionale. Le fluttuazioni di temperatura possono avere effetti dannosi sul fuso meiotico degli ovociti maturi⁶, sulla cinetica di sviluppo, sulla qualità delle blastocisti e sul metabolismo.⁷ Questi risultati dimostrano il valore del sistema di controllo della temperatura avanzato utilizzato nell'incubatore MINC+, come nell'incubatore MINC originale. La rimozione delle piastre dalla camera del MINC+ per la valutazione avrà un effetto trascurabile sulla temperatura del terreno di coltura nelle altre piastre rimaste nella camera.

Il terzo studio presenta ulteriori prove che il MINC+ è progettato in modo solido in termini di mantenimento dell'ambiente di coltura embrionale durante l'uso di routine. Dopo l'apertura e la successiva chiusura del coperchio, la concentrazione di CO₂ è tornata a valori prossimi all'equilibrio in circa 3 minuti. La cinetica di tale recupero dovrebbe ridurre al minimo le fluttuazioni di pH nel terreno di coltura risultanti dalle aperture del coperchio.

Il mantenimento del pH del terreno è importante per il corretto sviluppo dell'embrione.⁸ Ciò può essere particolarmente vero per le prime fasi dello sviluppo preimpianto, poiché gli ovociti non fecondati di diverse specie di mammiferi non presentano alcuni meccanismi comuni di scambio ionico per regolare il pH intracellulare,^{9,10} che apparentemente non viene ripristinato fino a diverse ore dopo la fecondazione.¹¹ Inoltre, il pH del terreno è un parametro critico per la fecondazione, con un pH leggermente alcalino ottimale in molte specie di mammiferi.^{12,13,14} Non va dimenticato che lo ione bicarbonato è anche un componente critico di alcuni processi fondamentali, tra cui la capacitazione spermatica^{12,15,16}, e queste variabili sono spesso confuse negli studi che cercano di capire gli effetti dell'uno o dell'altro parametro sulla fecondazione e sulla coltura embrionale.⁸ Tenere in considerazione l'importanza del pH come variabile nella FIV e nella coltura embrionale e utilizzare un incubatore che mantenga stabili i livelli di CO₂ e che restituisca rapidamente la CO₂ dopo gli eventi di disturbo è di fondamentale importanza.

Dati precedenti che studiavano l'effetto della rimozione di una piastra contenente terreno di coltura sotto uno strato oleoso sul pH del terreno hanno mostrato che il passaggio dalla concentrazione relativamente alta di CO₂ nell'incubatore alla concentrazione molto bassa di CO₂ dell'atmosfera normale per 10 minuti ha un effetto molto limitato (variazione del pH da 7,33 a 7,37).³ È emerso che la rimozione della piastra dall'incubatore per 1, 2 o 5 minuti non ha avuto un effetto misurabile sul pH. Se si deve prelevare una piastra dal MINC+, la camera deve essere aperta solo per un tempo molto breve (dell'ordine di 5 secondi). Durante questo intervallo, la concentrazione di CO₂ attorno alla piastra diminuirà rapidamente, ma verrà ristabilita in tempi relativamente brevi (entro pochi minuti, come mostrato sopra). In base ai dati del riferimento 3, ciò suggerisce che l'apertura del coperchio dell'incubatore per recuperare una piastra non avrà alcun effetto misurabile sul pH del terreno di coltura nelle piastre che rimangono nell'incubatore. Questo, unito al fatto che la temperatura del terreno di coltura subisce una variazione molto ridotta con un evento di apertura del coperchio di 5 secondi (dell'ordine di 0,05-0,1 °C), suggerisce che l'apertura della camera avrà un effetto molto ridotto sulle condizioni del terreno di coltura embrionale per le piastre che non vengono rimosse dalla camera.

Cook Medical sta lanciando una versione aggiornata del suo incubatore da tavolo, il MINC+. I dati sopra descritti dimostrano che il nuovo incubatore MINC+ è affidabile nel mantenimento delle variabili cruciali durante la coltura embrionale e, di conseguenza, è affidabile nel suo utilizzo nella pratica clinica della fecondazione in vitro.

Bibliografia

1. Swain JE. Optimal human embryo culture. *Semin Reprod Med.* 2015;33(2):103-117.
2. Swain JE. Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(5):535-537.
3. Conaghan J. pH control in the embryo culture environment. In: Quinn P, ed. *Culture media, solutions, and systems in human ART.* Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2014;142-154.
4. Cooke S, Tyler JPP, Driscoll G. Objective assessments of temperature maintenance using in vitro culture techniques. *J Assist Reprod Genet.* 2002;19(8):368-375.
5. Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, et al. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(1):5-9.
6. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod.* 2001;16(11):2374-2378.
7. Moriyama DF, Makri D, Maalouf M-N, et al. The effects of temperature variation treatments on embryonic development: a mouse study. *Sci Rep.* 2022;12(1):2489.
8. Swain JE. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Hum Reprod Update.* 2012;18(3):333-339.
9. Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Bicarbonate/chloride exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of the hamster. *Biol Reprod.* 1999;61(2):452-457.
10. FitzHarris G, Baltz JM. Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals. *Reproduction.* 2009;138(4):619-627.
11. Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Na⁺/H⁺ antiporter activity in hamster embryos is activated during fertilization. *Dev Biol.* 1999;208(1):244-252.
12. Zeng SM, Zhu SE, Wang YS, et al. An efficient method for in vitro fertilization in rabbits. *Anim Biotechnol.* 1999;10(1-2):15-23.
13. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* 1975;12(2):260-274.
14. Miyamoto H, Toyoda Y, Chang MC. Effect of hydrogen-ion concentration on in vitro fertilization of mouse, golden hamster, and rat eggs. *Biol Reprod.* 1974;10(4):487-493.
15. Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.* 1987;18(2):121-140.
16. Delgado-Bermúdez A, Yeste M, Bonet S, et al. A review on the role of bicarbonate and proton transporters during sperm capacitation in mammals. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):6333.

Consultare le informazioni sui rischi del prodotto nelle IFU all'indirizzo cookmedical.eu.

Servizio clienti

EU Website: cookmedical.eu
EDI: cookmedical.eu/edi
Distributors: +353 61239240, ssc.distributors@cookmedical.com
Austria: +43 179567121, oe.orders@cookmedical.com
Belgium: +32 27001702, be.orders@cookmedical.com
Denmark: +45 38487607, da.orders@cookmedical.com
Finland: +358 972519996, fi.orders@cookmedical.com
France: +33 171230269, fr.orders@cookmedical.com
Germany: +49 6950072804, de.orders@cookmedical.com
Hungary: +36 17779199, hu.orders@cookmedical.com
Iceland: +354 800 7615, is.orders@cookmedical.com
Ireland: +353 61239252, ie.orders@cookmedical.com
Italy: +39 0269682853, it.orders@cookmedical.com
Netherlands: +31 202013367, nl.orders@cookmedical.com
Norway: +47 23162968, no.orders@cookmedical.com
Spain: +34 912702691, es.orders@cookmedical.com
Sweden: +46 858769468, se.orders@cookmedical.com
Switzerland - French: +41 448009609, fr.orders@cookmedical.com
Switzerland - Italian: +41 448009609, it.orders@cookmedical.com
Switzerland - German: +41 448009609, de.orders@cookmedical.com
United Kingdom: +44 2073654183, uk.orders@cookmedical.com

USA Website: cookmedical.com

EDI: cookmedical.com/edi.do

Americas:

Phone: +1 812.339.2235, 800.457.4500, Fax: 800.554.8335
E-mail: customersupport@cookmedical.com

Australia:

Phone: +61 734346000, 1800777222, Fax: +61 734346001, 1800077283
E-mail: cau.custserv@cookmedical.com



AI-ESC-IR-OHNS-PI-RH-SUR-A4