

# FertiCult™ IVF medium

Cell culture medium for in vitro culture of human embryos, during the first 48 hours in culture

Document reference: FP09 I07 R01 B.4, Update: 24/OCT/2013



## GENERAL INFORMATION

FertiCult IVF medium is a ready to use formulation for the *in vitro* culture of mammalian embryos. It is designed for short term culture only (up to 48 hours in culture). The medium is complete and needs no further additives. If preferred 10 % patient serum v/v can be added.

FertiCult IVF medium is suitable for micro-droplets under oil or equally suited to culture in Falcon 3037 organ culture dishes (also 4-well Nunc culture dishes).

As with all IVF media, FertiCult IVF medium has to be **pre-incubated in CO<sub>2</sub> incubator with 5-6% CO<sub>2</sub> for 24 hours before use** (with lid opened).

## MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

Product code	Product description
FECU020	5 x 20ml FertiCult IVF medium
FECU050	5 x 50mL FertiCult IVF medium
FECU100	3 x 100mL FertiCult IVF medium
FECU020PHR	5 x 20ml FertiCult IVF medium w/ phenol red
FECU050PHR	5 x 50mL FertiCult IVF medium w/ phenol red
FECU100PHR	3 x 100mL FertiCult IVF medium w/ phenol red
FECU020PHR_G	5 x 20ml FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin
FECU050PHR_G	5 x 50mL FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin
FECU100PHR_G	3 x 100mL FertiCult IVF medium w/ phenol red and Gentamicin

## MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT

- Incubator at 37°C (5-6%CO<sub>2</sub>)
- Petri dishes (e.g. Falcon 3037)
- Mineral oil (e.g. FertiCult Mineral Oil)
- Laminar flow bench (ISO5 environment)
- Microscope
- Test tubes

## PRODUCT SPECIFICATIONS

- Chemical composition
- pH: between 7.20 - 7.50 (37°C – 5-6% CO<sub>2</sub>)
- Osmolality: 270 - 290 mOsm/kg
- Sterility: sterile (SAL 10<sup>-3</sup>)
- Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- Mouse Embryo Assay (blastocysts after 96h culture): ≥ 80% (48h exposure from zygote stage)
- Use of Ph Eur or USP grade raw materials if applicable
- Certificate of analysis and MSDS are available upon request

## PRE-USE CHECKS

- Do not use the product if it becomes discoloured (if medium contains phenol red), cloudy, or shows any evidence of microbial contamination
- Do not use the product if seal of the container is opened or defect when the product is delivered

## STORAGE AND CONSERVATION

- Store between 2-25°C, once opened store between 2-8°C
- Do not freeze before use
- Keep away from (sun)light
- After opening the container do not use the product longer than 7 days
- Do not use after expiry date

## WARNINGS AND PRECAUTION

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 Pharmacopoeia specifications by established processes.

Therefore, handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis.

Always wear protective clothing when handling specimens.

Always work under strict hygienic conditions (e.g. LAF-bench ISO Class 5) to avoid possible contamination, even when FertiCult IVF medium contains Gentamicin.

FertiCult IVF medium with phenol red and gentamicin contains the antibiotic Gentamicin Sulfate. Appropriate precautions should be taken to ensure that the patient is not sensitized to this antibiotic.

## METHOD

### PREPARATIONS FOR USE OF MICRO-DROPLETS

For micro-droplets, between 100-250µl of FertiCult IVF medium may be dispensed around the culture dish, up to 8 per 60mm dish.

The dish is then filled with 5ml of pre-washed and pre-equilibrated light mineral oil (nontoxic and preferably embryo tested, e.g. FertiCult Mineral Oil).

One oocyte is usually placed with about 10 000 sperm cells per micro-droplet, so if each patient during the next day is expecting 16 oocytes, at least two dishes per patient should be prepared. The dishes are then placed in the incubator (usually non-humidified) to equilibrate overnight at 37°C and under an atmosphere of 5-6% CO<sub>2</sub> in air.

**Overnight equilibration is highly recommended.**

### PREPARATIONS FOR USE IN OPEN SYSTEMS

In open systems such as with the Falcon or Nunc dishes, about 1ml of medium is placed in each well.

A further 3ml is placed in the reservoir surrounding the wells. This helps to maintain humidity as well as providing medium with which to wash the oocytes and embryos.

Up to five oocytes per dish (or well if using Nunc dishes) may be cultured together, usually with about 100 000 sperm cells per well.

So if each patient during the next day is expecting 15 oocytes at oocyte collection, at least six dishes per patient should be prepared (three for initial holding and cleaning of oocytes during collection and then three dishes for overnight culture).

When using Nunc dishes, two would be enough (since there are 4 wells per dish, the resulting 8 wells would be more than enough).

The dishes are then placed in the incubator to equilibrate overnight at 37°C and under an atmosphere of 5-6% CO<sub>2</sub> in air.

As with the micro-droplets method described above, **equilibration overnight is highly recommended.**

In the open system, paraffin oil is not necessary, but sometimes a 1ml layer of mineral oil may be added over the medium in the inner well. When using such an open system the incubator must be humidified.

## CULTURE

After equilibration overnight, the prepared dishes are ready for use.

During oocyte collection, oocytes are identified in the follicular aspirates and then washed before placing into the wells or droplets in the dish (as appropriate). Once oocyte collection is over, oocytes will be checked and may be rewashed, before then being placed into fresh droplets/wells for overnight culture.

Generally, within 6 hours of oocyte collection, oocytes will be inseminated with prepared sperm and then left overnight in the incubator.

The procedures described above are for the first 24 hours of culture.

Once embryos have been identified by the presence of two pro-nuclei, they are usually placed into fresh dishes containing fresh medium.

In the past, where people have used cord serum or patient serum, the initial medium contains 10% and the changeover (after fertilisation has been confirmed) 15%.

When using FertiCult IVF medium no extra protein is required at changeover. Dishes should be prepared as described above, equilibrated overnight, after which they will be ready to receive the newly fertilised embryos.

**NB.** Test tube culture is now rare, but for those still using this method, place 1ml of FertiCult IVF medium in each tube and then follow the same procedure as for Falcon or Nunc dishes.



FertiPro N.V. - Industriepark Noord 32 - 8730 Beernem, Belgium

Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 79 17 99

URL: <http://www.fertipro.com> - E-mail: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)

# FertiCult™ milieu de culture FIV

Milieu de culture cellulaire pour la culture in vitro d'embryons humains, pendant les premières 48 heures en culture

Référence du document : FP09 I07 R01 FR B.4



Mise à jour : 24/OCT/2013

## INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le milieu FIV FertiCult est une formulation prête à l'emploi pour la culture in vitro d'embryons de mammifères. Le milieu a été conçu pour une culture de courte durée uniquement (jusqu'à 48 heures en culture). Le milieu est complet et ne nécessite pas d'additifs.

Si l'on préfère, du sérum du patient 10 % v/v peut être additionné.

Le milieu de culture FIV convient pour les microgouttelettes recouvertes d'huile et se prête également à la culture dans des boîtes pour culture d'organes Falcon 3037 (ainsi que les boîtes de culture 4 puits Nunc).

Comme pour tous les milieux de FIV, le milieu FertiCult FIV doit être **pré incubé dans un incubateur CO<sub>2</sub> avec 5-6% CO<sub>2</sub> pendant 24 heures avant emploi** (couvercle ouvert).

## MATÉRIEL CONTENU DANS LE KIT

Code produit	Description produit
FECU020	5 x 20ml de milieu FertiCult FIV
FECU050	5 x 50ml de milieu FertiCult FIV
FECU100	3 x 100ml de milieu FertiCult FIV
FECU020PHR	5 x 20ml 5 x 20ml de milieu FertiCult FIV avec rouge de phénol
FECU050PHR	5 x 50ml 5 x 20ml de milieu FertiCult FIV avec rouge de phénol
FECU100PHR	3 x 100ml 5 x 20ml de milieu FertiCult FIV avec rouge de phénol
FECU020PHR_G	5 x 20ml de milieu FertiCult FIV avec rouge de phénol et gentamicine
FECU050PHR_G	5 x 50ml de milieu FertiCult FIV avec rouge de phénol et gentamicine
FECU100PHR_G	3 x 100ml de milieu FertiCult FIV avec rouge de phénol et gentamicine

## MATÉRIEL NON INCLUS DANS LE KIT

- Incubateur à 37 °C (5-6 % de CO<sub>2</sub>)
- Boîtes de Petri (p. ex. Falcon 3037)
- Huile minérale (p. ex. Huile minérale FertiCult)
- Hotte à flux d'air laminaire (environnement ISO 5)
- Microscope
- Éprouvettes

## SPÉCIFICATIONS DU PRODUIT

- Composition chimique
- pH : entre 7,20 - 7,50 (37°C) ; 5-6 % CO<sub>2</sub>)
- Osmolalité : 270 - 290 mOsm/kg
- Stérilité : stérile (SAL 10<sup>-3</sup>)
- Endotoxines : < 0.25 EU/ml
- Test MEA de survivance embryonnaire (blastocystes après 96h) : ≥ 80 % (après 48 h d'exposition à partir du stade zygote)
- Utilisation de produits de la pharmacopée européenne (Ph Eur) ou américaine (USP) le cas échéant
- Certificat d'analyse et fiches de sécurité disponibles sur demande

## VÉRIFICATIONS AVANT UTILISATION

- Ne pas utiliser le produit en cas de décoloration (si le milieu contient du rouge de phénol), trouble ou s'il présente des signes de contamination microbienne
- Ne pas utiliser le produit si le scellé du contenant est rompu ou défectueux à la livraison du produit

## INSTRUCTIONS DE STOCKAGE

- Conserver entre 2-25°C, après ouverture conserver entre 2-8°C.
- Ne pas congeler avant utilisation.
- Tenir à l'abri de la lumière (du soleil).
- Après ouverture du contenant, ne plus utiliser le produit après 7 jours.
- Ne pas utiliser une fois la date de péremption dépassée.

## AVERTISSEMENTS ET MESURES DE SÉCURITÉ

Les mesures standard pour prévenir les infections résultant de l'utilisation de médicaments préparés à partir de sang ou de plasma humains incluent la sélection des donneurs, 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/élimination virale. Toutefois, lorsque des médicaments préparés à partir de sang ou de plasma humains sont

administrés, la possibilité de transmission d'agents infectieux ne peut être totalement exclue. Ceci s'applique également aux virus inconnus ou émergents et autres agents pathogènes. Aucune transmission de virus n'a été rapportée avec l'albumine fabriquée conformément aux spécifications de la pharmacopée européenne selon les procédés établis.

Il faut manipuler les spécimens dans les conditions prévues pour les agents susceptibles de transmettre le VIH ou l'hépatite.

Il convient de toujours porter des vêtements de protection lors de la manipulation des spécimens.

Il faut veiller à toujours travailler dans les conditions d'hygiène stricte (par exemple, poste de travail avec de laminaire classe ISO 5) pour éviter une éventuelle contamination, même si le milieu FertiCult FIV contient du gentamicine.

Le milieu FertiCult avec rouge de phénol et gentamicine contient l'antibiotique sulfate de gentamicine. Des précautions adaptées devront être prises pour garantir que le patient n'est pas sensible à cet antibiotique.

## MÉTHODE

### PRÉPARATION POUR UTILISATION EN MICROGOUTTELETTES

Pour les microgouttelettes, entre 100 µl et 250 µl de milieu de FertiCult FIV peuvent être distribués autour de la boîte de culture, jusqu'à 8 par boîte de 60 mm.

Ensuite, la boîte est remplie de 5ml d'huile minérale légère, prélavée et pré-équilibrée (non toxique et ayant subi de préférence le test de biocompatibilité par essai sur embryon de souris, p. ex. Huile minérale FertiCult).

Généralement, un ovocyte est placé en culture avec environ 10 000 spermatozoïdes par microgouttelette. Si chaque patiente attend 16 ovocytes, au moins deux boîtes par patiente devront être préparées. Les boîtes sont ensuite placées dans l'incubateur (généralement non humidifié) pour équilibrer pendant une nuit à 37 °C et sous 5-6 % de CO<sub>2</sub> dans l'air.

**L'équilibrage pendant la nuit est hautement recommandé.**

### PRÉPARATION POUR UNE UTILISATION EN SYSTÈME OUVERT

Dans les systèmes ouverts tels que les boîtes Nunc ou Falcon, placer environ 1 ml de milieu dans chaque puits.

Placer 3 ml de milieu dans le réservoir situé autour des puits. Cela permettra de maintenir une certaine humidité et de laver les ovocytes et les embryons.

Jusqu'à cinq ovocytes par boîte (ou puits en cas d'utilisation de boîtes Nunc) peuvent être mis en culture ensemble, généralement avec environ 100 000 spermatozoïdes par puits.

Donc, si chaque patiente attend 15 ovocytes lors de la collecte des ovocytes, au moins six boîtes par patiente devraient être préparées (trois pour la conservation et le lavage initiaux des ovocytes pendant la collecte et ensuite trois boîtes pour la culture pendant la nuit).

Pour les boîtes Nunc, deux devraient être suffisants (comme il y a 4 puits par boîte, les 8 puits ainsi disponibles devraient largement suffire).

Ensuite, les boîtes sont placées dans l'incubateur pour équilibrer pendant une nuit à 37 °C et sous 5-6 % de CO<sub>2</sub> dans l'air.

Comme pour la méthode à base de microgouttelettes, **l'équilibrage pendant la nuit est hautement recommandé.**

Avec les systèmes ouverts, il n'y a pas besoin de paraffine, mais l'on peut parfois ajouter une couche de 1 ml d'huile minérale par-dessus le milieu dans le puits intérieur. En cas d'utilisation d'un tel système ouvert, l'incubateur doit être humidifié.

### CULTURE

Après équilibrage pendant la nuit, les boîtes préparées sont prêtes à l'emploi. Au cours de la collecte des ovocytes, les ovocytes sont repérés dans le liquide d'aspiration folliculaire, puis lavés avant d'être placés dans les puits ou dans les gouttelettes dans la boîte (selon le cas). Lorsque la collecte des ovocytes est terminée, les ovocytes seront vérifiés et pourront subir un second lavage avant d'être placés dans des gouttelettes/puits neufs pour être mis en culture pendant une nuit.

En général, 6 heures après la collecte des ovocytes, les ovocytes seront inséminés avec le sperme préparé et laissés dans l'incubateur pour la nuit.

Les procédures décrites ci-dessus s'appliquent aux 24 premières heures en culture. Lorsque les embryons ont été repérés par la présence de deux pronucléi, ceux-ci sont généralement placés dans des boîtes neuves contenant du milieu frais.

Par le passé, alors qu'on utilisait du sérum de cordon ombilical ou du sérum du patient, le milieu initial en contenait 10 % et le milieu de changement (après confirmation de la fertilisation) 15 %.

Avec le milieu FertiCult FIV, il n'y a pas besoin de protéines supplémentaires lors du changement. Les boîtes doivent être préparées comme décrit ci-dessus, équilibrées pendant la nuit, après quoi elles seront prêtes à recevoir les embryons nouvellement fertilisés.

**NB.** La culture en éprouvettes est rare de nos jours, mais pour ceux qui continuent à utiliser cette méthode, placer 1 ml de milieu FertiCult FIV dans chaque tube et suivre ensuite la même procédure que celle pour les boîtes Falcon ou Nunc.



FertiPro N.V. - Industriepark Noord 32 - 8730 Beernem, Belgium

Tel +32 (0)50 79 18 05 - Fax +32 (0)50 79 17 99

URL: <http://www.fertipro.com> - E-mail: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)