

## GAIN™ medium (EN)

### GAIN medium Early Stage GAIN medium Blastocyst

Cell culture media for the *in vitro* culture of human embryos and gametes

Doc.: FP09 I79 R01 C.3
Update: 16.10.2015
GAIN medium is sterilized by sterile filtration

<b>USED ABBREVIATIONS</b>
ICSI  IntraCytoplasmatic Sperm Injection
IUI  Intra-Uterine Insemination
IVF  In Vitro Fertilization
OCC  Oocyte-Corona-Cumulus

<b>INTENDED USE</b>

GAIN medium consists of 2 types of ready to use cell culture media for use with human embryos and gametes.

The media can be used for fertilization, zygotes and embryos culture through the cleavage stages and up to the expanded blastocyst stage and for embryo transfer.

- » **GAIN medium Early Stage (GAIN ES)** can be used for the handling of oocytes (in preparation of, or during IVF/ICSI) and for cell culture from fertilization up to 4-cell stage, for the processing of semen and for embryo transfer
- » **GAIN medium Blastocyst (GAIN BL)** is designed for embryo culture from 4-cell up to expanded blastocyst stage and for embryo transfer. Alternatively, the medium can be used immediately after fertilization, up till expanded blastocyst stage.

<i>For professional use only</i>
<b>COMPOSITION</b>

GAIN media are bicarbonate-buffered balanced salt solutions with 10mg/liter gentamicin and 3.5g/liter human serum albumin.

<b>MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT</b>	
Product code	Product description
GAIN010ES	1x 10ml GAIN medium Early Stage
GAIN010BL	1x 10ml GAIN medium Blastocyst

<b>MATERIAL NOT INCLUDED WITH THE KIT</b>

- » Well dishes
- » CO<sub>2</sub> incubator (37°C – 5% CO<sub>2</sub>)
- » LAF bench (ISO Class 5)
- » Microscope
- » Syringe (e.g. 1ml Plastipack)
- » Catheter (for embryo transfer)

<b>PRODUCT SPECIFICATIONS</b>

- » Chemical composition
- » pH @ 37°C and 5% CO<sub>2</sub>: 7.20-7.45
- » Osmolality: 270-290 mOsm/kg
- » Sterility: SAL 10<sup>-3</sup>
- » Endotoxins: < 0.25 EU/ml
- » Mouse Embryo Assay (blastocysts after 96h): ≥ 80% after 30min of exposure (zygote stage)
- » Use of Ph Eur or USP grade products if applicable
- » The certificate of analysis and MSDS are available upon request

<b>PRE-USE CHECKS</b>

- » Do not use the product if it becomes cloudy, or shows any evidence of microbial contamination.
- » Do not use the product if the seal of the container is opened or defect when the product is delivered.

<b>STORAGE INSTRUCTIONS</b>

- » Suitable for transport or short term storage at elevated temperatures (up to 5 days at 37°C).
- » Store at 2-8°C, do not freeze before use.
- » Keep away from (sun)light.
- » The products can be used safely up to 7 days after opening, when sterile conditions are maintained and the products are stored at 2-8°C.
- » Do not use after expiry date.

<b>WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>

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.

GAIN media contain the antibiotic Gentamicin Sulphate. Appropriate precautions should be taken to ensure that the patient is not sensitized to this antibiotic.

<b>METHOD</b>

**Medium pre-equilibration**  
Incubate the medium (in culture dishes or flasks with loosened screw tops) for at least 4 hours in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Ideally the medium should be pre-incubated overnight before use.

**General notes for use**  
GAIN medium should generally be used in an incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> at normal atmospheric pressure (see *Note on optimal pH and the atmospheric pressure*). The medium works well in 6 cm dishes with six 50 µl droplets covered with 6ml light paraffin oil (FertiCult Mineral Oil, FertiPro NV, Belgium). Per droplet 4 trimmed OCCs can be cultured and inseminated with approximately 0.1 million sperms.

**Standard culture method**  
» Use GAIN medium Early Stage for the handling of oocytes (in preparation of, or during IVF/ICSI), and culture of zygotes and embryos up to 4-cell stage.  
Note: After fertilization and denudation the zygotes have to be transferred to a **fresh droplet** of GAIN medium Early Stage.  
» Use GAIN medium Blastocyst for the culture of embryos from 4-cell up to expanded blastocyst stage. Make sure that the fresh medium is pre-incubated before transfer of the 4-cell stage embryos.

**Alternative culture method**  
» Use GAIN medium Early Stage for the handling of oocytes (in preparation of, or during IVF/ICSI) and fertilization.  
» Use GAIN medium Blastocyst for the culture of zygotes to expanded blastocyst stage. Make sure that the fresh medium is pre-incubated before transfer of the embryos.

**Refreshing of culture media**  
**It is advisable (but not mandatory) to transfer the embryos to fresh pre-incubated medium at least every 48 hours in culture.** Of course shorter culture times are possible (e.g. to the 8 cell stage at day 3, or morula/compaction at day 4).

**Sperm processing**  
GAIN Early Stage medium can be used to dilute and to wash semen for centrifugation. It can also be used in combination with a density gradient (Sii-Select Plus, FertiPro NV, Belgium) and/or swim-up, following standard procedures. The inseminates can be used for IUI, IVF and ICSI. Good quality sperm cells survive well over a period of 48 hours in GAIN medium.

Note: however that GAIN medium does not contain HEPES so in order to maintain a physiological pH, CO<sub>2</sub> incubation is necessary. If a HEPES-buffered medium is preferred, we recommend to use FertiCult Flushing medium (FertiPro N.V., Belgium).

**Note on optimal pH and the atmospheric pressure**  
GAIN medium must generally be used in an incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. At normal atmospheric pressure at sea level (101.3 kPa, range: 99 - 103 kPa) this will result in a medium with a pH of approximately 7.28. At lower atmospheric pressure or higher altitudes, the percentage CO<sub>2</sub> in the incubator must be increased.

Below is a table with estimated CO<sub>2</sub> setpoint at different air pressures. The only way to obtain certainty about the pH is to measure directly under culture conditions with a suitable well-calibrated pH meter. For optimal embryo culture the pH should be: 7.28 ± 0.05.

GAIN medium contains a low concentration of Phenol Red (approx. 0.001 mM) which is sufficient to indicate the pH. At the correct pH the colour is a pale bright red. If the medium turns orange or yellowish the pH is too low, if it turns pink or purplish the pH is too high.

Altitude (meters)	Atmospheric air pressure	CO <sub>2</sub> set point*
0 (sea level)	101.3 kPa	5.0%
0 - 400 m	100 - 96 kPa	5.0 - 5.2%
400 - 800 m	96 - 92 kPa	5.3 - 5.5%
800 - 1200 m	92 - 89 kPa	5.6 - 5.8%

\* Calculated as follows: (pressure sea level / pressure altitude) x 5%.

## GAIN™ medium (FR)

### GAIN medium Early Stage GAIN medium Blastocyst

Milieux de culture cellulaire pour la culture in vitro d'embryons et de gamètes humains

Doc.: FP09 I79 R01 C.3
Mise à jour : 16.10.2015
GAIN medium est stérilisé par filtration stérile

<b>ABRÉVIATIONS EMPLOYÉES</b>
ICSI  Injection spermatique intracytoplasmique
IU  Insémination intra-utérine
FIV  Fécondation in vitro
COC  Complexe ovocyte-cumulus

<b>UTILISATION PRÉVUE</b>

GAIN medium est composé de deux types de milieux de culture cellulaire prêts à l'emploi à utiliser avec des embryons et des gamètes humains.

Les milieux peuvent être employés pour la fécondation, la culture de zygotes et d'embryons pendant les stades de segmentation et jusqu'au stade blastocyste expansé et le transfert d'embryon.

- » **GAIN medium Early Stage (GAIN ES)** peut être utilisé pour la manipulation d'ovocytes (en préparation à, ou pendant, la FIV/ICSI), la culture cellulaire de la fécondation au stade quatre cellules, le traitement du sperme et le transfert d'embryon.
- » **GAIN medium Blastocyst (GAIN BL)** est conçu pour la culture d'embryons du stade quatre cellules au stade blastocyste expansé et le transfert d'embryon. Il est également possible d'utiliser le milieu immédiatement après la fécondation, jusqu'au stade blastocyste expansé.

<i>Réservé à l'usage professionnelle</i>
<b>COMPOSITION</b>

GAIN medium, solutions salines équilibrées tamponnées au bicarbonate contenant 10 mg/l de gentamicine et 3,5 g/l de sérum-albumine humaine.

<b>MATÉRIEL FOURNI AVEC LE KIT</b>	
Code de produit	Description du produit
GAIN010ES	1x 10ml GAIN medium Early Stage
GAIN010BL	1x 10ml GAIN medium Blastocyst

<b>MATÉRIEL NON FOURNI AVEC LE KIT</b>

- » Boîtes à puits
- » Incubateur à CO<sub>2</sub> (37°C – 5% CO<sub>2</sub>)
- » Poste de travail à flux d'air laminaire (classe ISO 5)
- » Microscope.
- » Seringue (par ex., Plastipack 1 ml)
- » Cathéter (pour le transfert d'embryon)

<b>CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT</b>

- » Composition chimique
- » pH à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> : 7.20-7.45
- » Osmolalité : 270-290 mOsm/kg
- » Stérilité : Niveau garanti de stérilité : 10<sup>-3</sup>
- » Endotoxines : < 0.25 EU/ml
- » Essai sur embryon de souris (blastocystes après 96 h) : ≥ 80%
- » Utilisation de produits de qualité Ph. Eur. ou USP, le cas échéant.
- » Le certificat d'analyse et la FS sont disponibles sur demande.

#### VÉRIFICATIONS PRÉALABLES À L'UTILISATION

- » Ne pas utiliser le produit s'il devient 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.

<b>INSTRUCTIONS POUR LA CONSERVATION</b>

- » Possibilité de transport ou de conservation de courte durée à des températures élevées (jusqu'à 5 jours à 37°C).
- » Conserver entre 2 et 8°C, ne pas congeler avant utilisation.
- » Tenir à l'abri de la lumière (du soleil).
- » Les produits peuvent être utilisés en toute sécurité jusqu'à 7 jours après ouverture si des conditions de stérilité sont respectées et si les produits sont conservés entre 2 et 8°C.
- » Ne pas utiliser après la date de péremption

<b>MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS</b>

Les mesures standard pour prévenir les infections résultant de l'utilisation des 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 avérée de virus n'a été rapportée avec l'albumine fabriquée conformément aux spécifications de la pharmacopée européenne selon les procédés établis. Manipuler par conséquent tous les échantillons comme s'ils pouvaient transmettre le VIH ou l'hépatite. Toujours porter des vêtements de protection lors de la manipulation des échantillons. Toujours travailler dans des conditions d'hygiène strictes (par ex., poste de travail à flux d'air laminaire, classe ISO 5) pour éviter une éventuelle contamination.

Les milieux GAIN contiennent du sulfate de gentamicine, un antibiotique. Des précautions adaptées devront être prises pour garantir que le patient n'est pas allergique à cet antibiotique.

<b>MÉTHODE</b>

**Prééquilibrage du milieu**

Incuber le milieu (dans des boîtes ou des flacons de culture dont le couvercle ou le bouchon a été desserré) pendant au moins quatre heures dans un incubateur à CO<sub>2</sub> à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Idéalement, le milieu doit être préincubé pendant une nuit avant utilisation.

**Considérations générales pour l'utilisation**  
GAIN medium doit en règle générale être utilisé dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> à la pression atmosphérique normale (voir *Remarque sur le pH optimal et la pression atmosphérique*). Le milieu fonctionne correctement dans des boîtes de 6 cm contenant six gouttelettes de 50 µl couvertes de 6 ml d'huile de paraffine légère (FertiCult Mineral Oil, FertiPro NV, Belgique). Pour chaque goutte, quatre COC dénudés peuvent être cultivés et inséminés au moyen d'environ 100 000 spermatozoïdes.

**Méthode de culture standard**  
» Utiliser GAIN medium Early Stage pour la manipulation d'ovocytes (en préparation à, ou pendant, la FIV/ICSI) et la culture de zygotes et d'embryons jusqu'au stade quatre cellules.  
Remarque : Après la fécondation et la dénudation, les zygotes doivent être transférés dans une gouttelette fraîche de GAIN medium Early Stage.  
» Utiliser GAIN medium Blastocyst pour la culture d'embryons du stade quatre cellules au stade blastocyste expansé. S'assurer que le milieu frais a été préincubé avant le transfert des embryons au stade quatre cellules.

**Méthode de culture alternative**  
» Utiliser GAIN medium Early Stage pour la manipulation d'ovocytes (en préparation à, ou pendant, la FIV/ICSI) et la fécondation.  
» Utiliser GAIN medium Blastocyst pour la culture de zygotes jusqu'au stade blastocyste expansé. S'assurer que le milieu frais a été préincubé avant le transfert des embryons.

**Rafraîchissement des milieux de culture**  
**Pendant la culture, il est recommandé (mais pas obligatoire) de transférer les embryons dans un milieu frais préincubé toutes les 48 heures au moins.**

Des durées de culture plus courtes sont bien entendu possibles (par ex., jusqu'au stade huit cellules au troisième jour ou morula/compaction au quatrième jour).

**Traitement des spermatozoïdes**  
GAIN medium Early Stage peut être utilisé pour diluer et laver le sperme avant la centrifugation. Il peut également être employé en combinaison avec un gradient de densité (Sii-Select Plus, FertiPro NV, Belgique) et/ou une migration ascendante, conformément aux procédures standard. Les inséminats peuvent être utilisés pour l'IUI, la FIV et l'ICSI. Les spermatozoïdes de bonne qualité survivent facilement pendant une période de 48 heures dans GAIN medium.

Remarque : Il convient toutefois de remarquer que GAIN medium ne contient pas d'HEPES, de sorte qu'une incubation dans du CO<sub>2</sub> est nécessaire pour maintenir un pH physiologique. Si un milieu tamponné à l'HEPES est préféré, nous recommandons d'utiliser FertiCult Flushing medium (FertiPro N.V., Belgique).

**Remarque sur le pH optimal et la pression atmosphérique**

GAIN medium doit en règle générale être utilisé dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. À la pression atmosphérique normale au niveau de la mer (101,3 kPa, fourchette : 99-103 kPa), le milieu obtenu aura un pH de 7,28 environ. Si la pression atmosphérique est plus faible ou l'altitude plus élevée, le pourcentage de CO<sub>2</sub> dans l'incubateur doit être accru. Le tableau ci-après fournit la valeur prédéfinie estimée de CO<sub>2</sub> pour différentes pressions atmosphériques. La seule façon de connaître le pH avec certitude est de le mesurer directement dans les conditions de culture au moyen d'un pH-mètre approprié et correctement étalonné. Pour une culture embryonnaire optimale, le pH doit être de : 7.28 ± 0,05. GAIN medium contient du rouge de phénol à faible concentration (environ 0,001 mM), une quantité suffisante pour indiquer le pH. Au pH adéquat, la couleur est rouge pâle. Si le milieu devient orange ou jaunâtre, le pH est trop bas ; s'il prend une teinte violacée, le pH est trop élevé.

Altitude (mètres)	Pression atmosphérique	Valeur prédéfinie de CO <sub>2</sub> *
0 (niveau de la mer)	101.3 kPa	5.0%
0 - 400 m	100 - 96 kPa	5.0 - 5.2%
400 - 800 m	96 - 92 kPa	5.3 - 5.5%
800 - 1200 m	92 - 89 kPa	5.6 - 5.8%

\* Calculé comme suit : (pression au niveau de la mer/pression à l'altitude réelle) x 5 %.

## GAIN™ medium (IT)

### GAIN medium Early Stage GAIN medium Blastocyst

Terreni di coltura cellulare per la coltura in vitro di embrioni e gameti umani

Doc.: FP09 I79 R01 C.3
Aggiornamento: 16.10.2015
GAIN Medium è sterilizzato per filtrazione

<b>ABBREVIAZIONI UTILIZZATE</b>
ICSI  Iniezione intracitoplasmatica di sperma
IUI  Inseminazione intrauterina
IVF  Fecondazione in vitro
OCC  Cumulo-corona-ovocita

<b>USO PREVISTO</b>

GAIN medium consiste di 2 tipi di terreni, pronti all'uso, per coltura cellulare di embrioni e gameti umani. Il terreno può essere utilizzato per la fecondazione, per la coltura degli zigoti e degli embrioni durante gli stadi di scissione e fino allo stadio di blastocisti espansa e per il trasferimento dell'embrione.

- » **GAIN medium Early Stage (GAIN ES)** può essere utilizzato per la manipolazione degli ovociti (in preparazione o durante la IVF/ICSI) e per la coltura cellulare dalla fecondazione allo stadio di 4 cellule, per il trattamento del seme e per il trasferimento dell'embrione.
- » **GAIN medium Blastocyst (GAIN BL)** è ideato per la coltura dell'embrione dallo stadio di 4 cellule allo stadio di blastocisti espansa e per il trasferimento dell'embrione. In alternativa, il terreno di coltura può essere utilizzato immediatamente dopo la fecondazione, fino allo stadio di blastocisti espansa.

<i>Per esclusivo uso professionale</i>
<b>COMPOSIZIONE</b>

Il terreno GAIN consiste in soluzioni saline bilanciate e tamponate con bicarbonato, con aggiunta di 10mg/litro di gentamicina e 3,5 g/litro di albumina sierica umana.

<b>MATERIALI INCLUSI NEL KIT</b>	
Codice del prodotto	Descrizione del prodotto
GAIN010ES	1x 10ml GAIN medium Early Stage
GAIN010BL	1x 10ml GAIN medium Blastocyst

<b>MATERIALI NON INCLUSI NEL KIT</b>

- » Piastre a pozzetto
- » Incubatore a CO<sub>2</sub> (37°C – 5% CO<sub>2</sub>)
- » Cappa a flusso laminare (ambiente ISO 5)
- » Microscopio
- » Siringa (p.es. Plastipack 1ml)
- » Catetere (per il trasferimento dell'embrione)

<b>SPECIFICHE DEL PRODOTTO</b>

- » Composizione chimica
- » pH a 37°C e CO<sub>2</sub> al 5%: 7,20-7,45
- » Osmolalità: 270-290 mOsm/kg
- » Sterilità: SAL 10<sup>-3</sup>
- » Endotossine < 0,25 EU/ml
- » Analisi su embrioni di topo (mouse embryo assay) (blastocisti dopo 96 ore): ≥ 80%
- » Utilizzare prodotti di grado Ph Eur o USP, se applicabile
- » Il certificato di analisi e la MSDS sono disponibili su richiesta

<b>VERIFICHE PRE-UTILIZZO</b>

- » Non utilizzare il prodotto se questo diventa torbido o mostra evidenza di contaminazione batterica.
- » Non utilizzare il prodotto se il sigillo del contenitore è aperto o difettoso quando il prodotto viene consegnato.

<b>MODALITÀ DI CONSERVAZIONE</b>

- » Idoneo per il trasporto o la conservazione per un tempo breve a temperatura elevata (fino a 5 giorni a 37°C).
- » Conservare a 2-8°C, non congelare prima dell'uso.
- » Tenere lontano dalla luce (solare).
- » I prodotti possono essere usati in sicurezza fino a 7 giorni dopo l'apertura, quando le condizioni sterili sono mantenute e i prodotti sono conservati a 2-8°C.
- » Non usare dopo la data di scadenza.

<b>AVVERTENZE E PRECAUZIONI</b>

Le misure standard per prevenire infezioni derivanti dall'utilizzo dei medicinali preparati da sangue o plasma umano includono la selezione dei donatori, lo screening di donazioni individuali e delle riserve di plasma per marcatori specifici dell'infezione e l'inclusione di fasi produttive efficaci per l'inattivazione/rimozione dei virus. Ciononostante, quando vengono somministrati medicinali preparati da sangue o plasma umano, la possibilità di trasmettere agenti infettivi non può essere esclusa del tutto. Ciò si applica anche a virus e altri patogeni emergenti o sconosciuti. Non vi sono segnalazioni di trasmissioni comprovate di virus con l'albumina prodotta secondo le specifiche della Farmacopea Europea mediante processi consolidati. Di conseguenza, è necessario manipolare tutti i campioni come potenzialmente in grado di trasmettere HIV o epatite. Indossare sempre un abbigliamento protettivo quando si manipolano i campioni. Lavorare sempre rispettando rigorose condizioni igieniche (ambiente ISO 5, ad es. cappa a flusso laminare) per evitare una possibile contaminazione. GAIN medium contengono l'antibiotico gentamicina solfato. È opportuno prendere le adeguate precauzioni per evitare che il paziente sviluppi una sensibilizzazione a questo antibiotico.

