

**ISolate®**

**Catalog No. 99264** 12 x 6 mL, 2 x 50 mL, 2 x 100 mL

## Ready to Use Density Gradient Medium at Two Concentrations

**Catalog No. 99275** 100 mL

### Stock Solution

**Catalog No. 99306** 100 mL

### Concentrate

#### REFERENCES

Adanija GK, Jackson KV: *Comparison of Percoll® and ISolate® in the Preparation of Semen for use in Assisted Reproductive Technologies*. 53rd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Cincinnati, Ohio; 0-113, 1997.

Tarchala SM, Fahy MM, Hauserman HM, Kallmann K, Volentine K, Radwanska E, Bnór Z, Molo MW, Rawlins RG: *ISolate® As a New Method of Sperm Separation*. 53rd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Cincinnati, Ohio; P-116, 1998.

Miller, KF, Fry KL, Aciaga RL, Falcone T: *Semen preparation for in-vitro fertilization using ISolate® results in sperm recovery, fertilization and pregnancy outcomes that are indistinguishable from those obtained with Percoll®*. 14th Embryology, Göteborg, Sweden; P-116, 1998.

Tarchala SM, Volentine KK, Rawlins RG: *A comparison of sperm processing using ISolate® and Pure Sperm™*. 14th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Göteborg, Sweden; R-041, 1998.

ISolate® is a Registered Trademark of Irvine Scientific

Percoll® is a Registered Trademark of Pharmacia Biotech, AB Sweden

#### Glossary of Symbols:

REF Catalog Number

LOT Lot Number

STERILE A Sterilized using aseptic processing techniques (filtration)

Year - Month - Day Expiration:

Caution, consult accompanying documents

Storage Temperature

Do not resterilize

Do not re-use

Do not use if package is damaged

Manufacturer: Irvine Scientific®

Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a (licensed healthcare practitioner).

CE Mark

Emergo Europe - Pimmsesgracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands

\*Symbol Reference - EN ISO 15223-1, Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labeling.

#### ENGLISH

**EU Caution:** For Professional Use Only.

#### PRODUCT DESCRIPTION

ISolate® is a density gradient medium designed to separate the motile fraction of sperm from seminal fluid. As a two layer gradient system, it effectively reduces cellular contaminants such as dead sperm, white blood cells and miscellaneous debris. The resulting sample contains predominantly motile sperm.

ISolate is a membrane filtered, aseptically processed colloidal suspension of silica particles stabilized with covalently bound hydrophilic silane in HEPES-buffered HTF. The sterility assurance level (SAL) is 10<sup>-6</sup>. ISolate is tested and found negative for pyrogens by rabbit pyrogen test.

#### DIRECTIONS FOR USE

**Catalog #99264 - READY TO USE COLLOIDAL SILICA AT TWO CONCENTRATIONS (50% and 90%)**

##### A. Materials Suggested:

- Irvine Scientific Catalog #99264 (6mL, 50 mL or 100mL vial kit)
- Sperm Washing Medium
- Irvine Scientific Catalog #9983 Centrifuge
- Irvine Scientific Catalog #IS-300 Sterile, disposable conical centrifuge tubes
- Pasteur Pipettes, sterile
- Incubator, 37°C

##### B. Gradient Preparation:

No preliminary dilutions are necessary. Each vial of upper and lower layer gradient is ready for use. Continue to GENERAL PROCEDURE section of product insert.

#### Catalog #99275 - STOCK SOLUTION

90% density gradient medium for use in a one-step procedure or for further dilution.

##### A. Materials Suggested:

- ISolate Stock Solution
- Irvine Scientific Catalog #99275 Modified Human Tubal Fluid
- Irvine Scientific Catalog #90126 Sperm Washing Medium
- Irvine Scientific Catalog #9983 Centrifuge
- Irvine Scientific Catalog #IS-300 Sterile, disposable conical centrifuge tubes
- Pasteur Pipettes, sterile
- Incubator, 37°C

##### B. Gradient Preparation:

Two solutions are required to perform the gradient sperm separation method: An upper layer and a lower layer:

- Upper Layer solution - 50%.
  - Take STOCK SOLUTION (Catalog #99275) and pipette 5.6 mL into a sterile centrifuge tube
  - Add 4.4 mL of Modified Human Tubal Fluid (Catalog #90126)
  - Cap tube and invert gently 3-4 times to allow for complete mixing
- Lower Layer solution - 90%.
  - Aliquot 10 mL of the STOCK SOLUTION into a sterile centrifuge tube and cap (No further dilutions necessary - Stock Solution is 90%)
  - Label tube as "LOWER LAYER"
- Continue to GENERAL PROCEDURE section of product insert. (NOTE: 10 mL Upper Layer and 10 mL Lower Layer will process approximately 5 semen samples.)

#### Catalog #99306 - CONCENTRATE

Colloidal silica concentrate for further dilution into density gradients; formulated in an isotonic buffer and approximates the density of unilluminated Percoll®. ISolate® CONCENTRATE was evaluated according to this package insert at 50% and 90% gradients. Each laboratory may choose to make gradients at different concentrations which should be evaluated for effectiveness.

- Materials Suggested: ISolate® Concentrate

the pellet using a suitable volume of appropriate medium. The sample is now ready for analysis.

For additional details on the use of these products, each laboratory should consult its own laboratory procedures and protocols which have been specifically developed and optimized for your individual medical program.

#### COMPOSITION:

Colloidal Suspension of Silica Particles

- Sodium Chloride
- Potassium Chloride
- Magnesium Sulfate
- Potassium Phosphate
- Calcium Chloride
- Sodium Bicarbonate
- HEPES
- Dextrose
- Sodium Pyruvate
- Sodium Lactate

#### STORAGE INSTRUCTIONS AND STABILITY

Store the unopened containers refrigerated at 2° to 8°C.

Warm to ambient or incubator (37°C) temperature prior to use.

Do not freeze or expose to high temperatures.

ISolate is stable until the expiration date shown on the box and bottle labels when stored as directed.

#### PRECAUTIONS AND WARNINGS

This device is intended to be used by staff trained in assisted reproductive procedures. These procedures include the intended application for which this device is intended.

The user facility of this device is responsible for maintaining traceability of the product and must comply with national regulations regarding traceability, where applicable.

ISolate will appear opaque. This is normal for this product. Do not use any vial of medium which shows evidence of particulate matter or contamination (nonuniform cloudiness). ISolate should be tightly capped when used in a CO<sub>2</sub> incubator to avoid pH changes.

This product contains no preservatives, antibiotics, or protein supplements. To avoid problems with contamination, handle using aseptic techniques.

**In case of damage, do not use. Please discard or return to Manufacturer for replacement.**

- Irvine Scientific Catalog #99306 Modified Human Tubal Fluid
- Irvine Scientific Catalog #90126 Sperm Washing Medium
- Irvine Scientific Catalog #9983 Centrifuge
- Irvine Scientific Catalog #IS-300 Sterile, disposable conical centrifuge tubes
- Pasteur Pipettes, sterile
- Incubator, 37°C

##### B. Gradient Preparation:

Two solutions are required to perform the gradient sperm separation method: An upper layer and a lower layer:

- Upper Layer solution - 50%.
  - Take CONCENTRATE (Catalog #99306) and pipette 4.5 mL into a sterile centrifuge tube
  - Add 5.5 mL of Modified Human Tubal Fluid (Catalog #90126)
  - Cap tube and invert gently 3-4 times to allow for complete mixing
- Lower Layer solution - 90%.
  - Take CONCENTRATE (Catalog #99306) and pipette 8.1 mL into a sterile centrifuge tube
  - Add 1.9 mL of Modified Human Tubal Fluid (Catalog #90126)
  - Cap tube and invert gently 3-4 times to allow for complete mixing
- Continue to GENERAL PROCEDURE section of product insert.

**Note:** The terms 50% and 90% do not represent an actual concentration. The 50% and 90% are relative concentrations based on the previous nomenclature that defined a 1:9 dilution of Percoll® as equal to a 100% working, isotonic solution.

#### GENERAL PROCEDURE

The following is a general procedure for a two-step gradient separation of motile sperm from semen. The volume and concentration can be modified to meet each laboratory's preference (i.e. mini-gradient, cryopreserved semen, three-layer gradient).

- Bring all media components to room temperature or 37°C.
- Using a sterile pipette, transfer 1.5 - 2.0 mL of the "LOWER LAYER" into a sterile, disposable, conical centrifuge tube.
- Using a new sterile pipette, transfer an equal volume of "UPPER LAYER" on top of the "LOWER LAYER". This is done by contacting the surface of the "LOWER LAYER" at the side of the tube with the lip of the pipette. Carefully dispense the "UPPER LAYER" by spraying the pipette tip around the circumference of the tube in an upward motion as the level of the "UPPER LAYER" rises.
- Centrifuge 1.5 - 2.0 mL of liquefied semen onto the "UPPER LAYER" using a new sterile pipette.
- Centrifuge for 10-20 minutes at approximately 200 - 300g. \* Carefully expose the pellet by either aspirating off the "UPPER" and "LOWER LAYERS", or directly removing the pellet and transferring to a new sterile centrifuge tube.  
**Note:** The quality of the sperm sample should be evaluated and taken into consideration when determining the proper centrifugation speed and time. These should be adjusted according to the individual specimen quality for optimization of the procedure.
- Using a new sterile pipette, add 2.0 - 3.0 mL of appropriate washing medium such as Sperm Washing Medium (IS Catalog #9983) or Modified HTF (IS Catalog #90126) with protein supplementation. Resuspend the isolated pellet. Centrifuge (~200g) for 8 - 10 minutes and remove the supernatant. Repeat this step for a second wash. Discard the supernatant and resuspend

## LIETUVIŲ K.

**PERSPĖJIMAS PAGAL ES REGLAMENTĄ:** Skirta tik profesionaliajam naudojimui.

### PRODUKTO APRAŠYMAS

*ISolate*® yra tankio gradiento terpė, skirta iš sėklos sekreto atskirti jautriąją spermatozoidų frakciją. Ši dviejų sluoksnių gradientinė sistema veiksmingai sumažina laštelinius teršalus, tokius kaip negyvi spermatozoidai, leukocitai ir įvairios dalelių atplaišos. Galutinis mėginys daugiausia susideda iš jautrių spermatozoidų.

*ISolate* yra membranių filtrą naudojant filtruota, aseptiškai apdorota koloidinė silicio dioksido dalelių suspensija, stabilizuota kovalentinėmis jungtimis prisijungusiu hidrofiliniu silanu HEPES buferintame HTF skystyje. Sterilumo užtikrinimo lygis (SAL) yra  $10^{-3}$ . Atlikus pirogenų nustatymo bandymą su triušiais, *ISolate* karščiavimo nesukėlė.

### NAUDOJIMO NURODYMAI

#### Katalogo Nr. 99264 – PARUOŠTAS NAUDOTI KOLOIDINIS SILICIO DIOKSIDAS, DVIEJŲ KONCENTRACIJŲ (50% ir 90%)

##### A. Rekomenduojamos medžiagos:

*ISolate*

- Irvine Scientific katalogo Nr. 99264 (6 ml, 50ml arba 100 ml buteliukų rinkinys)
- Sperm Washing Medium (spermos plovimo terpė)
- Irvine Scientific katalogo Nr. 9983 Centrifuga
- Irvine Scientific katalogo Nr. IS-300 Sterilūs, vienkartiniai kūginiai centrifuginiai mėgintuvėliai Pastero pipetės, sterilios Inkubatorius, 37 °C temperatūra

##### B. Gradiento paruošimas:

Iš anksto praskiesti nereikia. Visi viršutinio ir apatinio sluoksnių gradiento buteliukai yra paruošti naudoti. Toliau žiūrėkite produkto pakuotės lapelio skyrių BENDROJI PROCEDŪRA.

#### Katalogo Nr. 99275 – STOCK SOLUTION (pradinis tirpalas)

90% tankio gradientinė terpė, skirta vieno etapo procedūrai arba tolesniam skiedimui.

##### A. Rekomenduojamos medžiagos:

*ISolate* STOCK SOLUTION (pradinis tirpalas)

- Irvine Scientific katalogo Nr. 99275 Modified Human Tubal Fluid
- Irvine Scientific katalogo Nr. 90126 Sperm Washing Medium (spermos plovimo terpė)
- Irvine Scientific katalogo Nr. 9983 Centrifuga
- Irvine Scientific katalogo Nr. IS-300 Sterilūs, vienkartiniai kūginiai centrifuginiai mėgintuvėliai Pastero pipetės, sterilios Inkubatorius, 37 °C temperatūra

##### B. Gradiento paruošimas:

Taikant gradientinį spermatozoidų atskyrimo metodą, naudojami du tirpalai: viršutinio sluoksnių tirpalas ir apatinio sluoksnių tirpalas.

##### 1. Viršutinio sluoksnių tirpalas – 50%:

- a) Paėmę STOCK SOLUTION (katalogo Nr. 99275), 5,6 ml pradinio tirpalo pipete įlašinkite į sterilų centrifuginį mėgintuvėlį;
- b) Pridėkite 4,4 ml Modified Human Tubal Fluid terpės (katalogo Nr. 90126);
- c) Mėgintuvėlį uždenkite ir atsargiai 3–4 kartus apverskite, kad jo turinys visiškai susimaišytų;
- d) Mėgintuvėlį pažymėkite VIRŠUTINIS SLUOKSNIS;

##### 2. Apatinio sluoksnių tirpalas – 90%:

- a) 10 ml STOCK SOLUTION pradinio tirpalo atidrinkite į sterilų centrifuginį mėgintuvėlį ir uždenkite (daugiau skiesti nereikia – STOCK SOLUTION yra 90% koncentracijos).
- b) Mėgintuvėlį pažymėkite APATINIS SLUOKSNIS;

##### 3. Toliau žiūrėkite produkto pakuotės lapelio skyrių BENDROJI PROCEDŪRA. (PASTABA: 10 ml

viršutinio sluoksnių tirpalo ir 10 ml apatinio sluoksnių tirpalo kiekis yra skirtas apdoroti apytikriai 5 spermos mėginius.)

#### Katalogo Nr. 99306 – CONCENTRATE (koncentratas)

Koloidinio silicio dioksido koncentratas, skirtas tolesniam skiedimui pagal tankio gradientą; paruoštas izotoniniame buferiniame tirpale, tankis apytikriai atitinka neskiestos Percoll® terpės tankį. *ISolate*® CONCENTRATE koncentratą ištyrus šiame pakuotės lapelyje nurodytais metodais, nustatyta 50% ir 90% gradientų koncentracija. Kiekviena laboratorija gali pasigaminti skirtingų koncentracijų gradientus, kurių veiksmingumą reikia įvertinti.

##### A. Rekomenduojamos medžiagos:

*ISolate*® koncentratas

- Irvine Scientific katalogo Nr. 99306 Modified Human Tubal Fluid
- Irvine Scientific katalogo Nr. 90126 Sperm Washing Medium (spermos plovimo terpė)
- Irvine Scientific katalogo Nr. 9983 Centrifuga
- Irvine Scientific katalogo Nr. IS-300 Sterilūs, vienkartiniai kūginiai centrifuginiai mėgintuvėliai Pastero pipetės, sterilios Inkubatorius, 37 °C temperatūra

##### B. Gradiento paruošimas:

Taikant gradientinį spermatozoidų atskyrimo metodą, naudojami du tirpalai: viršutinio sluoksnių tirpalas ir apatinio sluoksnių tirpalas.

##### 1. Viršutinio sluoksnių tirpalas – 50%:

- a) Paėmę CONCENTRATE (katalogo Nr. 99306), 4,5 ml koncentrato pipete įlašinkite į sterilų centrifuginį mėgintuvėlį;
- b) Pridėkite 5,5 ml Modified Human Tubal Fluid terpės (katalogo Nr. 90126);
- c) Mėgintuvėlį uždenkite ir atsargiai 3–4 kartus apverskite, kad jo turinys visiškai susimaišytų;
- d) Mėgintuvėlį pažymėkite VIRŠUTINIS SLUOKSNIS;

##### 2. Apatinio sluoksnių tirpalas – 90%:

- a) Paėmę CONCENTRATE (katalogo Nr. 99306), 8,1 ml koncentrato pipete įlašinkite į sterilų centrifuginį mėgintuvėlį;
- b) Pridėkite 1,9 ml Modified Human Tubal Fluid terpės (katalogo Nr. 90126);
- c) Mėgintuvėlį uždenkite ir atsargiai 3–4 kartus apverskite, kad jo turinys visiškai susimaišytų;
- d) Mėgintuvėlį pažymėkite APATINIS SLUOKSNIS;

##### 3. Toliau žiūrėkite produkto pakuotės lapelio skyrių BENDROJI PROCEDŪRA. (PASTABA: 10 ml viršutinio sluoksnių tirpalo ir 10 ml apatinio sluoksnių tirpalo kiekis yra skirtas apdoroti apytikriai 5 spermos mėginius.)

*Pastaba: 50% ir 90% dydžiai neapibrėžia koncentracijos. 50% ir 90% yra santykinės koncentracijos dydžiai, pagrįsti ankstesne nomenklatūra, kuri apibrėžė 1:9 santykiu praskiestą Percoll® preparatą kaip lygiavertį 100% darbiniam izotoniniam tirpalui.*

#### BENDROJI PROCEDŪRA

Toliau aprašyta bendroji procedūra dviejų etapų gradientiniam jautrių spermatozoidų išskyrimui iš spermos. Tūrij ir koncentraciją galima keisti pagal atskiros laboratorijos poreikius (t. y., minigradientas, kriokonservuota sėkla, trisluksnis gradientas).

1. Visus terpės komponentus atšildykite iki kambario arba 37 °C temperatūros.
2. Sterilia pipete perkelkite 1,5–2,0 ml APATINIO SLUOKSNIO tirpalo į sterilų vienkartinį kūginį centrifugavimo mėgintuvėlį.
3. Nauja sterilia pipete ant APATINIO SLUOKSNIO viršaus perkelkite tokį patį VIRŠUTINIO SLUOKSNIO tirpalo kiekį. Tai atliekama pipetės antgaliu paliečiant APATINIO SLUOKSNIO paviršių prie mėgintuvėlio šono. Atsargiai išlašinkite VIRŠUTINĮ SLUOKSNĮ spirališkai sukdam

pipetės antgalį aplink mėgintuvėlio kraštą link viršaus, kai VIRŠUTINIO SLUOKSNIO lygis kyla.

4. Nauja sterilia pipete 1,5–2,0 ml suskystėjusios spermos atsargiai užlašinkite ant VIRŠUTINIO SLUOKSNIO.
5. Centrifuguokite 10–20 minučių esant apytikriai 200–300 x g režimui.\* Atsargiai išskirkite granule įsiurbdami VIRŠUTINIO ir APATINIO SLUOKSNIO tirpalo arba granules tiesiai išsiurbdami ir perkeldami į naują sterilų centrifuginį mėgintuvėlį.

Pastaba: Reikia įvertinti spermos mėginio kokybę ir į tai atsižvelgiant numatyti tinkamą centrifugavimo greitį ir laiką. Procedūros optimizavimui, juos reikia pakoreguoti atsižvelgiant į atskiros mėginio kokybę.

6. Nauja sterilia pipete įlašinkite 2,0–3,0 ml atitinkamos plovimo terpės, tokios kaip Sperm Washing Medium (IS katalogo Nr. 9983) arba Modified HTF (IS katalogo Nr. 90126) su baltyminių priedais. Izoliuotą granule resuspenduokite. Centrifuguokite 8–10 minučių (~200 x g režimu) ir pašalinkite supernatantą. Pakartokite šį etapą antrojo plovimo metu. Išmeskite supernatantą, o granule resuspenduokite tinkamame reikiamos terpės kiekyje. Dabar mėginys yra paruoštas analizei.

Dėl išsamesnių šių produktų naudojimo gairių kiekviena laboratorija turi žiūrėti savo vidaus darbo tvarkos taisykles ir metodinius nurodymus, specialiai parengtus ir optimizuotus pagal atskiros medicininės programos nuostatas.

#### COMPOSITION:

Koloidinė silicio dalelių suspensija  
Natrio chloridas  
Kalio chloridas  
Magnio sulfatas  
Kalio fosfatas  
Kalcio chloridas  
HEPES  
Natrio bikarbonatas  
Dekstrozė  
Natrio piruvatas  
Natrio laktatas

#### LAIKYMO SĄLYGOS IR STABILUMAS

Neatidarytas talpyklės laikykite šaldytuve 2 °C–8 °C temperatūroje.

Prieš naudojimą atšildykite iki aplinkos arba inkubatoriaus (37 °C) temperatūros.

Negalima užšaldyti, būtina saugoti nuo aukštos temperatūros.

Laikant pagal nurodymus, *ISolate* produktas išlieka stabilus iki tinkamumo datos, pažymėtos dėžutės ir butelio etiketėse.

#### ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

Ši priemonė yra skirta naudoti specialistams, apmokytiems atlikti pagalbinių apvaisinimo procedūras. Tos procedūros apima priemonės taikymą pagal numatytąją paskirtį.

Šią priemonę naudojanti įstaiga yra atsakinga už produkto atsekamumo duomenų kaupimą ir privalo laikytis savo šalies norminių atsekamumo užtikrinimo reikalavimų, jei taikoma.

*ISolate* išvaizda yra matinė. Tai šiam produktui yra normalu. Negalima naudoti jokio terpės buteliuko, jei skystyje matyti kietųjų dalelių ar užterštumo (nevienalytis drumstumas).

Laikant CO2 inkubatoriuje, *ISolate* reikia sandariai uždengti, kad nepasikeistų pH pusiausvyra.

Šio produkto sudėtyje nėra konservantų, antibiotikų ir baltymų priedų. Norint išvengti užkrėtimo, naudojimo metu reikia laikytis metodinių aseptikos reikalavimų.

**Jeigu produktas pažeistas, jo nenaudokite. Išmeskite arba grąžinkite gamintojui, kad pakeistų.**