

Clasificación de espermatozoides

Contar un mínimo de 300 espermatozoides por muestra, de acuerdo con los siguientes criterios:

• Espermatozoides sin fragmentación de ADN

- Espermatozoides con halo grande: aquellos cuya anchura del halo de cromatina es similar o mayor que el diámetro del núcleo (Fig. 1)
- Espermatozoides con halo de tamaño medio: el tamaño de su halo se encuentra entre los de halo grande y los de halo pequeño (Fig. 2)

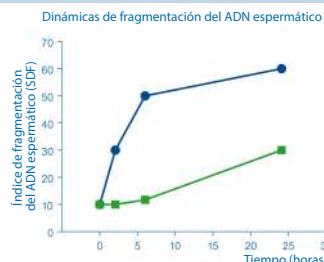
• “Otros”: núcleos celulares que no corresponden a los espermatozoides. Una de las características morfológicas que los distinguen es la ausencia de cola. Estas células no deben incluirse en la estimación de la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado.

• Espermatozoides con ADN fragmentado:

- Espermatozoides con halo pequeño: la anchura del halo de cromatina es similar o inferior a 1/3 del diámetro del núcleo (Fig. 3)
- Espermatozoides sin halo: (Fig. 4).
- Espermatozoides sin halo y degradados: aquellos que no presentan halo y presentan un núcleo irregular o débilmente teñido (Fig. 5).

Evaluación de los resultados

La línea azul de la gráfica representa un paciente con un rápido aumento en la dinámica de fragmentación del ADN dentro de las primeras horas de incubación. Por el contrario, la línea verde representa a un paciente con una dinámica estable de fragmentación del ADN. El perfil de la curva debe considerarse como un parámetro adicional para la calidad del semen, útil para manejar adecuadamente las muestras en el laboratorio y programar diferentes tipos de ART.



Advertencias, medioambiente y precauciones

Todos los reactivos y muestras de los pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos y el usuario debe usar guantes, protección ocular y bata de laboratorio al realizar la prueba.

Se debe tener cuidado para evitar el contacto con la piel o los ojos, así como evitar la inhalación. La solución ácida (DA) contiene ácido clorhídrico, y la solución de lisis (LS) contiene ditiotretol y ECOSURF™. Trabaje en un entorno ventilado y siga la hoja de datos de seguridad del fabricante con respecto a un manejo seguro.

El producto sobrante debe desecharse en un recipiente de riesgo biológico adecuado después de su utilización. No lo vierta en alcantarillas o vías fluviales. No libere los productos utilizados al medio ambiente.

Siga las normas de seguridad específicas de las instalaciones de su laboratorio con respecto al almacenamiento de productos químicos y la eliminación de productos tóxicos, así como la exposición a ellos.

No coma, beba ni fume en el área donde se manipulan las muestras y los reactivos del kit.

No use el kit más allá de la fecha de caducidad, que aparece en la etiqueta del producto.

La hoja de datos de seguridad del material está disponible bajo pedido.

Condiciones de almacenamiento

Después de recibir el kit, guárdelo entre 2-8 °C. La fecha de caducidad está en la etiqueta. Después de abrirlo, el kit es estable durante 9 meses.



dyn-halosperm®

Kit **REF** HT - DHS5G2
para 5 determinaciones

	consultar instrucciones de uso
	referencia del producto (número de catálogo)
	número de lote
	número de serie
	fecha de caducidad
	fabricante
	fecha de fabricación
	producto sanitario para diagnóstico in vitro
	contiene suficiente para "n" pruebas
	límite de temperatura
	mantener seco
	atención
	peligro



Halotech DNA ha desarrollado dyn-halosperm® en respuesta a las necesidades de los usuarios de la prueba SCD (test de dispersión de la cromatina espermática) para evaluar la dinámica de fragmentación del ADN espermático en espermatozoides humanos.

IVD solo para uso profesional.

Principio del método

Los espermatozoides intactos no fijados (muestras frescas, congeladas o diluidas) se sumergen en un microgel inerte de agarosa sobre un portaobjetos pretratado. Un tratamiento ácido inicial desnaturaliza el ADN de los espermatozoides con ADN fragmentado. A continuación, la solución de lisis elimina la mayoría de las proteínas nucleares. Cuando no hay rotura masiva del ADN, los nucleoides producen grandes halos de bucles de ADN que se extienden a partir de un núcleo central. Los nucleoides de los espermatozoides con el ADN fragmentado no muestran un halo de dispersión o el halo es mínimo.

Características de funcionamiento

Sensibilidad	93.0 %
Especificidad	93.0 %
Repetibilidad	93.4 %
Reproducibilidad	94.0 %
Veracidad	91.6 %
Exactitud	97.1 %
Sustancias interferentes	-

Descripción de los componentes del kit

Cada kit contiene lo necesario para realizar 5 test. Los componentes son:

- (ACS) Soporte celular de agarosa; 2 tubos de tapón de rosca
- (SCS) Portaobjetos pretratados; 5 unidades
- (ET) Tubos de Eppendorf; 5 unidades
- (CT) Tubos de colores; 20 unidades (4 colores)
- Solución 1 (DA) Agente Desnaturalizante, 10 ml
- Solución 2 (LS) Solución de lisis, 10 ml
- Solución 3 (SSA) Solución de tinción A, 10 ml
- Solución 4 (SSB) Solución de tinción B, 10 ml
- (HSF) Flotador, 1 unidad
- Instrucciones de uso

Material y equipo necesarios no proporcionados con el kit

Microscopio de campo claro, nevera a 2-8 °C, baño a 37 °C y 95-100 °C, guantes de PVC (cloruro de polivinilo), cubreobjetos de vidrio (24 x 50 mm). Micropipetas, placas de Petri o bandejas similares, pipetas desechables, agua destilada, microondas, papel de filtro o similar, etanol al 70% y al 100%. Solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Asegúrese de que todos los equipos estén calibrados.

Muestra de semen

Las muestras de semen fresco deben recogerse en un recipiente estéril. El ensayo de fragmentación del ADN espermático debe realizarse inmediatamente después de la descongelación y los tiempos de procesamiento de las alícuotas deben registrarse cuidadosamente para que los resultados se puedan representar con precisión en un gráfico.

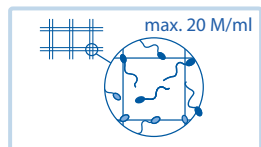
Instrucciones de uso

El análisis de la dinámica de fragmentación del ADN espermático es un proceso que recrea el efecto del tiempo en la calidad del ADN cuando se incuba una muestra de esperma con un ovocito. Esto es similar a lo que ocurre durante la FIV o la IIU. Es decir, una muestra de semen se prepara para su uso y se incuba a 37 °C en incubadora o baño.

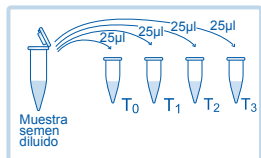
Se recomiendan dos marcos temporales en función de cómo se utilice la información resultante en ciclos específicos de ART.

Corto: 0 minutos (T₀), 1 hora (T₁), 2 horas (T₂), 6 horas (T₃). **Largo:** 0 minutos (T₀), 2 horas (T₁), 6 horas (T₂), 24 horas (T₃).

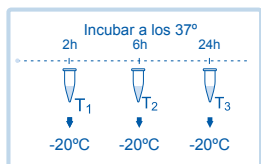
Preparación de muestras de esperma



1. Diluya la muestra de semen en un diluyente de esperma o PBS hasta una concentración máxima de 20 millones de espermatozoides por ml.

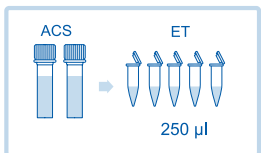


2. Alicuote 25 µl de semen en cada uno de los tubos Eppendorf coloreados suministrados con el kit y rotúelos como T₀, T₁, T₂ y T₃.



3. Congelar la muestra T₀ a -20 °C inmediatamente (no es necesario añadir criopreservante). Incubar las tres alícuotas restantes en una incubadora a 37 °C. Retirar las alícuotas de la incubadora en los momentos elegidos y congelar a -20 °C. Los valores de fragmentación del ADN espermático de las muestras congeladas no varían si se analizan rápidamente después de la descongelación.

Inclusión de muestra de esperma en microgel de agarosa.

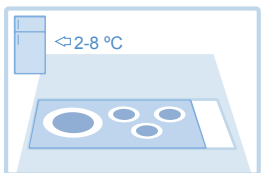
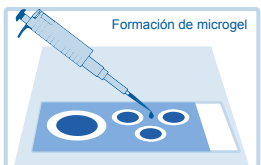
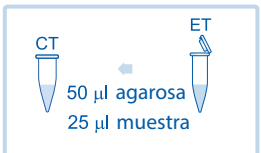


4. Coloque los tubos de agarosa (ACS) en el flotador y fúndalos usando un baño a 95-100 °C durante 5 minutos hasta que se funda por completo. De lo contrario, si prefiere fundir la agarosa usando un microondas, llene un vaso de precipitados con 100 ml de agua. A continuación, coloque el ACS ligeramente abierto con el flotador dentro del vaso de precipitados y caliente a máxima potencia durante 1,5 minutos. Observe constantemente y detenga el proceso tan pronto como el agua comience a hervir. **Por favor, ¡no mantenga el ACS hirviendo dentro del microondas!** Alicuote 5 tubos Eppendorf con 250 µl de agarosa fundida. Utilice un ET por portaobjetos. Inmediatamente después, mantenga el Eppendorf a 37 °C durante 5 minutos para evitar la gelificación.

4.2 Los tubos Eppendorf restantes que no se vayan a utilizar en ese momento se guardarán en la nevera junto con el kit.

4.3 Mantenga las soluciones 1 y 2 a temperatura ambiente (22-25 °C aprox.) durante todo el proceso.

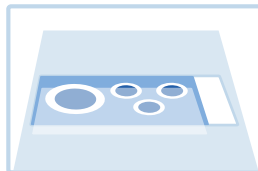
5. Mientras, descongele las muestras a temperatura ambiente durante 3-5 minutos. Transfiera 50 µl de agarosa líquida a cada tubo de color (CT) descongelado y mezcle suavemente. Mantenga los tubos a 37 °C.



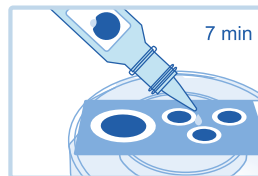
6. Coloque 6 µl de la suspensión celular T₀ en el pocillo T₀ en el portaobjetos pretratado. De la misma manera, transfiera 2 µl de las mezclas de los tubos T₁, T₂ y T₃ a los pocillos correspondientes del portaobjetos pretratado. Inmediatamente después, coloque un cubreobjetos de vidrio de 24 x 50 mm encima de la muestra y presione suavemente, evitando la formación de burbujas de aire.

Los portaobjetos deben mantenerse en posición horizontal durante todo el proceso.

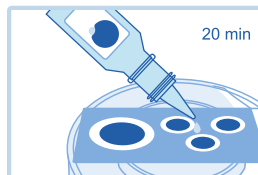
7. Coloque el portaobjetos sobre una superficie fría (por ejemplo, una placa de metal o vidrio preenfriada a 2-8 °C) y transfíralo a la nevera a 2-8 °C, durante 5 minutos para solidificar la agarosa.



Procesamiento de muestras de esperma

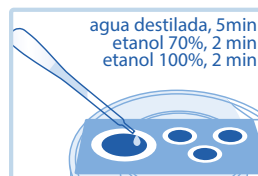


8. Saque el portaobjetos de la nevera y retire el cubreobjetos deslizándolo suavemente. Todo el procesamiento debe realizarse a temperatura ambiente (22-25 °C aprox.).



9. Coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada como se sugiere en la figura en una placa de Petri o bandeja similar. Aplique la solución 1 (DA) en el pocillo asegurándose **de que esté completamente cubierto por el reactivo durante todo el proceso**. Incubar durante 7 minutos. A continuación, retire el reactivo inclinándolo y coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada como se sugiere en la figura. **Es muy importante retirar el reactivo sin agitar el portaobjetos. Realizaremos la eliminación inclinando y dejando deslizar el reactivo.**

10. Aplique la Solución 2 (LS) en el pocillo asegurándose de que esté completamente cubierto. Incubar durante 20 minutos. A continuación, retire el reactivo por inclinación y coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada como se sugiere en la figura. Es muy importante retirar el reactivo sin agitar el portaobjetos. **La eliminación se debe realizar inclinando el portaobjetos y dejando deslizar el reactivo.**

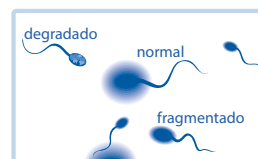


11. Lavar el portaobjetos durante 5 minutos cubriendo con abundante agua destilada y utilizando una pipeta desechable. A continuación, retire el agua por inclinación y coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada como se sugiere en la figura. Deshidratar cubriendo con etanol al 70%, utilizando una pipeta desechable e incubar durante 2 minutos. Retirar y aplicar etanol al 100% durante 2 minutos. Retirar y dejar secar sobre papel de filtro o similar. Después del secado, los portaobjetos procesados pueden conservarse en cajas de portaobjetos a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro durante varios meses.

Tinción y visualización.



12. Coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada en una placa de Petri o bandeja similar. Aplique la Solución 3 (SSA) en los pocillos, asegurándose que estén completamente cubiertos. Incubar durante 7 minutos. A continuación, retire la tinción por inclinación y coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada. Aplique la Solución 4 (SSB) en los pocillos, asegurándose de que estén completamente cubiertos. Incubar durante 7 minutos. Luego, retire la tinción por inclinación. Retire el exceso de tinción y deje secar a temperatura ambiente.



13. Visualice mediante microscopía de campo claro. Si la tinción es demasiado intensa, el portaobjetos puede lavarse con agua del grifo. Si la tinción es demasiado débil, sumerja el portaobjetos en etanol al 100%, deje secar y repita el paso 12. Para la tinción para microscopía de fluorescencia, póngase en contacto con el distribuidor autorizado.

Interpretando los resultados

$$\text{SDF (\%)} = \frac{(\text{fragmentado} + \text{degradado})}{\text{total de espermatozoides contados}} \times 100$$
$$\text{ADN del esperma} = \frac{(T_h - T_0)}{h}$$

tasa de fragmentación

h: Tiempo de incubación

14. Calcule el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado. Los resultados deben evaluarse teniendo en cuenta todos los hallazgos clínicos y de laboratorio relacionados con la muestra de semen.

Para ensayos futuros

Utilice tantos tubos Eppendorf (ET con agarosa alícuotada) como muestras de semen se vayan a evaluar. Coloque el ET en el flotador y funda en el baño (o un vaso de precipitados con agua en una placa caliente) a 95-100 °C durante 5 minutos o hasta que esté completamente fundida. De lo contrario, si prefiere fundir la agarosa con un microondas, llene 100 ml de agua en un vaso de precipitados. A continuación, coloque el ET ligeramente abierto con el flotador dentro del vaso de precipitados y caliéntelo a máxima potencia durante 1,5 minutos. Vigile constantemente y detenga el proceso tan pronto como el agua comience a hervir. Continúe con el protocolo desde el paso 4.3.

Por favor, ¡no mantenga el ACS hirviendo dentro del microondas!