

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 muy 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).

Control positivo

Control positivo: todos los espermatozoides se muestran con halo a excepción de los espermatozoides degradados. Para su realización, siga las instrucciones de uso, omitiendo el paso 7.

Advertencias, medioambiente y precauciones

Todas las muestras y reactivos 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 ditiotritol 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 lo use 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

Tras recibir el kit, guárdelo entre 2-8 °C. La fecha de caducidad se encuentra en la etiqueta. Una vez abierto, el kit es estable durante 9 meses.



halosperm® es una marca registrada por halotech DNA, S.L.
C/FARADAY 7, 1ª PLANTA CAMPUS DE CANTOBLANCO – 28049 MADRID ESPAÑA
Tel: + 34 91 279 69 50 / www.halotechdna.com / info@halotechdna.com



halosperm® G2

Kit **REF** HT - HSG2

Para 10 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 halosperm® G2 en respuesta a las necesidades de los usuarios de la prueba SCD (test de dispersión de la cromatina espermática) para evaluar la fragmentación del ADN espermático en 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 en un portaobjetos pretratado. Un tratamiento ácido inicial desnaturaliza el ADN de los espermatozoides con ADN fragmentado.

Después de esto, la solución de lisis elimina la mayoría de las proteínas nucleares. Cuando hay rotura masiva del ADN, los nucleoides de los espermatozoides con ADN fragmentado no muestran un halo de dispersión o el halo es mínimo. Este test es una ayuda al diagnóstico. La interpretación de los resultados se hará bajo criterio médico.

Características de funcionamiento

Sensibilidad	93.0 %
Especificidad	93.0 %
Repetibilidad	93.4 %
Reproducibilidad	94.0 %
Veracidad	91.6 %
Exactitud	97.1 %
Sustancias interferentes	-
Valor de corte ⁽¹⁾	IIU: SDF ≤ 20 %; FIV/ICSI: SDF ≤ 25 %

[1] Esteves SC et al., Andrologia 2021 53(2):e13874. doi: 10.1111/and.13874.

Descripción de los componentes del kit

Cada kit contiene lo necesario para realizar 10 test. Los componentes son:

- (ACS) Soporte celular de agarosa; 1 tubo con tapón de rosca
- (SCS) Portaobjetos pretratados; 10 unidades
- (ET) Tubos Eppendorf; 10 unidades
- Solución 1(DA) Agente Desnaturalizante, 10 ml
- Solución 2 (LS) Solución de Lisis, 10 ml
- Solución 3 (SSA) Solución de tinción de eosina A, 10 ml
- Solución 4 (SSB) solución de tinción de tiazina B, 10 ml
- (HSF) Flotador, 1 unidad
- Instrucciones de uso

Material y equipo necesarios no proporcionados con el kit

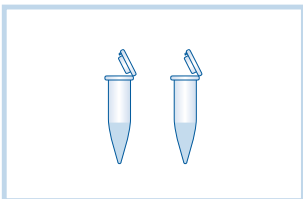
Microscopio de campo claro, nevera a 2-8 °C, baño a 37 °C y 95-100 °C, guantes de PVC (cloruro de polivinilo), cubreobjetos de vidrio (24 x 24 mm). Micropipetas, placas de Petri o bandejas similares, pipetas desechables, agua destilada, microondas, papel de filtro o similar, etanol al 70% y al 100%.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

Asegúrese de que todos los equipos estén calibrados.

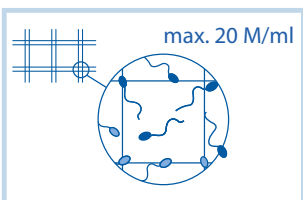
Muestra de semen

Las muestras de semen recién obtenidas se deben recoger en un recipiente estéril. El ensayo de fragmentación del ADN espermático se debe realizar inmediatamente tras la obtención o descongelación de la muestra de esperma criopreservada.

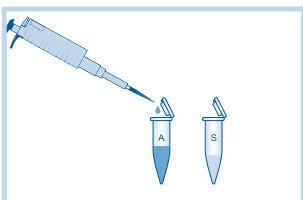
Instrucciones de uso



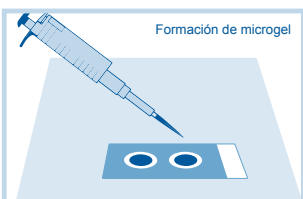
1. Coloque el tubo con agarosa (ACS) en el flotador y fúndalo en un baño de agua (o un vaso de precipitados con agua en una placa caliente) a 95-100 °C durante 5 minutos o hasta que se funda por completo. De lo contrario, si prefiere fundir la agarosa con un microondas, llene 100 ml de agua en un vaso de precipitados. A continuación, coloque el ACS ligeramente abierto con el flotador dentro del vaso de precipitados y caliéntelo 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 10 tubos Eppendorf (ET) con 100 µl de agarosa fundida. Inmediatamente después, mantenga los Eppendorf a utilizar a 37 °C durante 5 minutos para evitar la gelificación.
- 1.2 Los tubos Eppendorf restantes que no se vayan a utilizar en ese momento se guardarán en la nevera junto con el kit.
- 1.3 Mantenga las soluciones 1 y 2 a temperatura ambiente (22-25 °C, aprox.) durante todo el proceso.
- 1.4 Prepare y seleccione los portaobjetos pretratados (SCS) que se van a utilizar.



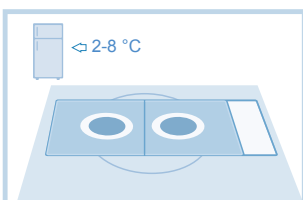
2. Diluya la muestra de semen en un diluyente de esperma o PBS hasta un máximo de 20 millones de espermatozoides por ml.



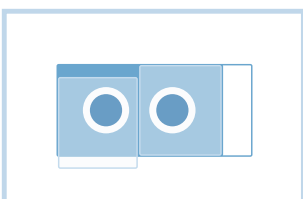
3. Inmediatamente después, transfiera 50 µl de la muestra de semen al tubo Eppendorf (ET) y mezcle suavemente con una micropipeta. Evite la formación de burbujas.



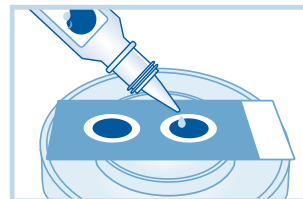
4. A continuación, coloque 8 µl de la suspensión celular en el centro del pocillo de muestra ("S"). Cubra con un cubreobjetos. Presione suavemente, evitando la formación de burbujas de aire. Los portaobjetos deben mantenerse en **posición horizontal** durante todo el proceso. Utilice el pocillo "C" para procesar una muestra control.



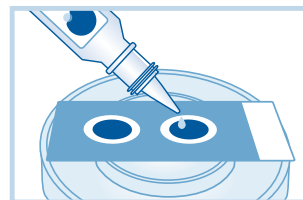
5. Coloque el portaobjetos sobre una superficie fría (por ejemplo, una placa de metal o vidrio preenfriada a 2-8 °C) y transféralo al frigorífico a 2-8 °C, durante 5 minutos para solidificar la agarosa.



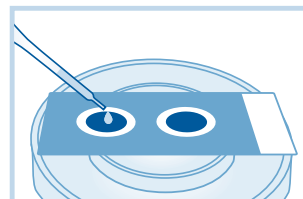
6. Saque el portaobjetos de la nevera y retire el cubreobjetos **deslizándolo suavemente**. Todo el procesado debe realizarse a temperatura ambiente (22-25 °C aprox.).



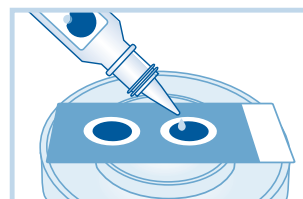
7. Coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada, como se sugiere en la figura, en una placa de Petri o una bandeja similar. Aplique la Solución 1 (DA) sobre el pocillo **asegurándose de que esté completamente cubierto por el reactivo durante todo el proceso**. Incubar durante 7 minutos. 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.**



8. 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.**

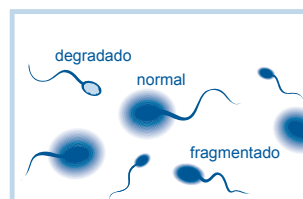


9. Lavar el portaobjetos durante 5 minutos cubriendo con abundante agua destilada utilizando una pipeta desechable. A continuación, retire el reactivo por inclinación y coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada, como se sugiere en la figura. Deshidratar cubriendo con etanol al 70%, 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.



10. 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 de que estén completamente cubiertos. Incubar durante 7 minutos. A continuación, retire la tinción por inclinación y coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada.

11. 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.



12. Visualice mediante microscopía de campo claro. Si la tinción es demasiado intensa, el portaobjetos se puede lavar con agua corriente. Si la tinción es demasiado débil, sumerja el portaobjetos en etanol al 100%, déjelo secar y repita desde el paso 10.

$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Fragmentado} + \text{degradado}}{\text{número total de células contadas}} \times 100$$

13. 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!