

Clasificación de las CCs

Cuente un mínimo de 100 CCs por muestra de acuerdo con los siguientes criterios:

Células del cúmulo sin ADN fragmentado:

Las células presentan un halo de dispersión de cromatina compactada alrededor del núcleo donde el diámetro del núcleo y el halo puede ser equivalente (Fig. 1. Normal).

Células del cúmulo con ADN fragmentado:

Las células presentan un halo de dispersión de cromatina grande, no compactado y débilmente teñido alrededor del núcleo (Fig. 1. Fragmentado). El halo es más grande que el diámetro del núcleo. Las células altamente fragmentadas tienen núcleos reducidos y halos mínimos de cromatina dispersa.

Células del cúmulo no afectadas:

Las células no muestran alteración de la cromatina. Estas células deben clasificarse como "células no afectadas" y deben ser consideradas para calcular el porcentaje del índice de fragmentación del ADN (DFI) de la muestra (Fig. 1. No afectada).

Advertencias, medioambiente y precauciones

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

Asegúrese de que haya una buena ventilación y siga la hoja de seguridad del fabricante con respecto a la manipulación segura.

El producto sobrante debe desecharse en un recipiente de riesgo biológico adecuado después de la prueba.

No lo vierta en alcantarillas ni 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 producto está disponible bajo pedido.

Condiciones de almacenamiento

Tras recibir el kit, guárdelo entre 2-8 °C. Después de abrirlo, el kit es estable durante 12 meses. La fecha de caducidad está en la etiqueta.



Kit **REF** HT - OVS80
para 80 determinaciones

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



ovoselect® está diseñado para determinar el índice de fragmentación del ADN de las células del cumulus oophorus (CCs).

IVD solo para uso profesional.

Principio del método

Las CCs intactas, no fijadas y recién aisladas se sumergen en un microgel inerte de agarosa sobre un portaobjetos pretratado. La solución de lisis elimina las proteínas nucleares y, en ausencia de daño en el ADN, las células presentan un halo compacto de dispersión de cromatina alrededor del núcleo. Las células con daño en el ADN presentan un halo de dispersión de cromatina grande, no compacto y débilmente teñido alrededor del núcleo. Este kit se diseñó para la evaluación indirecta de la calidad de los ovocitos. La interpretación de los resultados se hará bajo criterios médicos. No se necesita ningún control interno.

Características de funcionamiento

Sensibilidad	88.47 %
Especificidad	99.71 %
Repetibilidad	92.14 %
Reproducibilidad	91.98 %
Veracidad	95.53 %
Exactitud	97.08 %
Sustancias interferentes	-

Descripción de los componentes del kit

Cada kit contiene lo necesario para realizar 80 determinaciones. Los componentes son:

-(ACS) Soporte celular de agarosa; 2 tubos de tapón de rosca	-Solución 2 (SB) Tampón de estabilización, 10 ml
-(SCS) Portaobjetos pretratados; 10 unidades	-Solución 3 (SSA) Solución de tinción de eosina A, 10 ml
-(ET0.2) Tubos Eppendorf; 80 unidades	-Solución 4 (SSB) Solución de tinción de tiazina B, 10 ml
-(ET0.5) Tubos Eppendorf; 10 unidades	-(HSF) Flotador, 1 unidad
-Solución 1 (LS) Solución de lisis, 10 ml	-Instrucciones de uso

Material y equipo necesarios no proporcionados con el kit

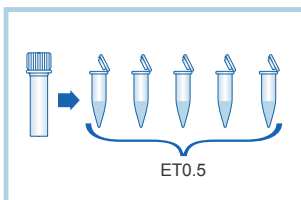
Microscopio de campo claro, nevera a 2-8 °C, baño de agua a 37 °C y 95-100 °C, guantes de PVC (cloruro de polivinilo), cubreobjetos de vidrio (24 x 24 mm). Micropipetas, placas de Petri o bandejas similares, pipetas desechables, tubos Eppendorf o similares, agua destilada, microondas, papel de filtro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

Asegúrese de que todos los equipos estén calibrados.

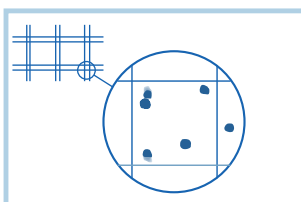
Muestra de CCs

Utilizar muestras de CCs recién aisladas, tan pronto como sea posible después de obtener los ovocitos de la paciente. El kit se puede utilizar en CCs debidamente criopreservadas. Los portaobjetos no se pueden procesar más de una vez.

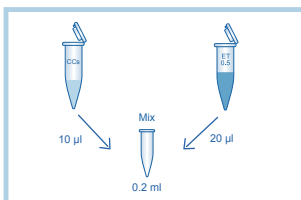
Instrucciones de uso



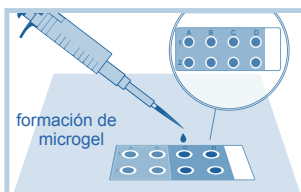
- 1.1 Coloque los tubos de agarosa con tapón de rosca (ACS) en el flotador y funda usando un baño (o un vaso de precipitados con agua en una placa calefactable) a 95-100 °C durante 5 minutos o hasta que esté completamente fundida. De lo contrario, si prefiere fundir la agarosa en un microondas, llene un vaso de precipitados con 100 ml de agua. 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 (ET0.5), 5 por cada tubo de agarosa con tapón de rosca, con 180 µl de agarosa fundida. Inmediatamente después, mantenga el Eppendorf a utilizar a 37 °C durante 5 minutos para evitar la gelificación.
- 1.2 El resto de los tubos Eppendorf (ET0.5) que no se van a utilizar en ese momento se almacenarán en la nevera junto con el kit.
- 1.3 Mantenga las soluciones 1 y 2 a temperatura ambiente durante todo el proceso.
- 1.4 Prepare los portaobjetos pretratados (SCS) que se vayan a utilizar.



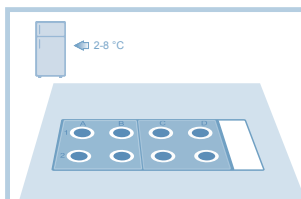
2. Aíslar las CCs de cada ovocito individual de acuerdo con el método utilizado habitualmente en el laboratorio. Cada portaobjetos está preparado para el análisis de 8 muestras de CCs aisladas de 8 ovocitos. Examinar mediante microscopía de contraste de fase con el objetivo 40x verificando que haya 10-15 células por campo. Si el número de células es inferior a 10, transfíralas a un tubo Eppendorf o similar y añada 0,5-1 ml de PBS o medio de cultivo celular a cada tubo. Centrifugar a 300xg durante 2-5 minutos. Retire el sobrenadante y vuelva a suspender el pellet celular en PBS o medio de cultivo para ajustar a una concentración final de 10-15 células por campo usando el objetivo 40x.



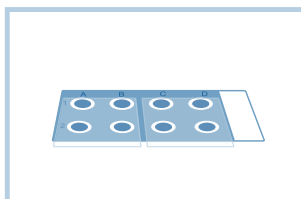
3. Una vez que la agarosa (ET0.5) esté a 37 °C, primero transfiera 10 µl de CCs a un tubo Eppendorf de 0,2 ml (ET0.2) suministrado con el kit. Mantenga los tubos con las células a 37 °C. A continuación, añada 20 µl de agarosa líquida y mezcle bien evitando la formación de burbujas. Mantener la mezcla de células y agarosa a 37 °C hasta preparar las 8 muestras para evitar la gelificación prematura.



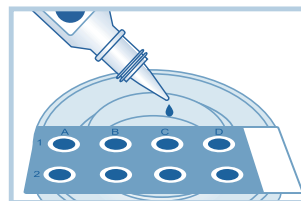
4. Dispense un volumen de 1,5-2 µl de la suspensión celular en los pocillos marcados y rápidamente cubra cada 4 pocillos con un cubreobjetos de 24 x 24 mm. Presione suavemente evitando la formación de burbujas de aire. Repetir la misma acción en los otros 4 pocillos.



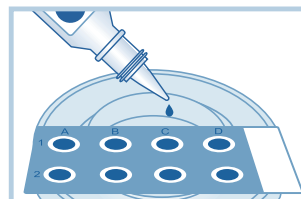
5. Coloque el portaobjetos sobre una superficie fría (por ejemplo, una placa de metal o vidrio preenfriada a 2-8 °C) y transfíralo a la nevera a 2-8 °C, durante 5 minutos para solidificar la agarosa.



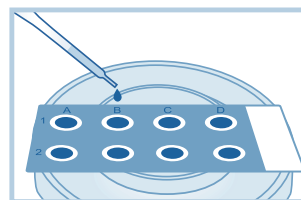
6. Saque el portaobjetos de la nevera y retire el cubreobjetos deslizándolo suavemente. Todo el procesamiento debe realizarse a temperatura ambiente.



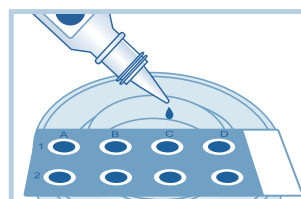
7. Coloque el portaobjetos horizontalmente en una posición elevada en una placa de Petri o bandeja similar como se sugiere en la figura. Aplique la solución 1 (LS) en los pocillos asegurándose de que esté completamente cubiertos por el reactivo durante todo el proceso. Incubar durante 3 minutos. Luego, retire el reactivo inclinando el portaobjetos y vuélvalo a colocar horizontalmente en una posición elevada como se sugiere en la figura. Es muy importante retirar el reactivo sin agitar el portaobjetos.



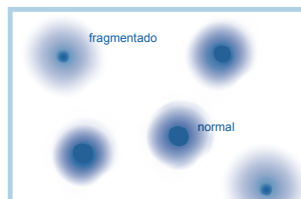
8. Aplique la solución 2 (SB) en los pocillos asegurándose de que estén completamente sumergidos. Incubar durante 3 minutos. Luego, retire el reactivo inclinando el portaobjetos y vuélvalo a colocar horizontalmente en una posición elevada como se sugiere en la figura. Es muy importante retirar el reactivo sin agitar el portaobjetos.



9. Deshidratar la muestra aplicando etanol al 70%, utilizando una pipeta desechable e incubar durante 2 minutos. Eliminar y aplicar etanol 100% durante 2 minutos. Eliminar y dejar que se seque en posición horizontal sobre papel de filtro o similar.



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 sumergidos. Incubar durante 15 minutos. A continuación, retire la solución inclinando el portaobjetos y colóquelo de nuevo horizontalmente en una posición elevada.
11. Aplique la Solución 4 (SSB) en los pocillos, asegurándose nuevamente de que estén completamente sumergidos. Incubar durante 15 minutos. A continuación, retire la solución inclinando el portaobjetos. Lave brevemente el portaobjetos con agua corriente. Retire el exceso de agua y deje que se seque a temperatura ambiente.



12. Visualice mediante microscopía de campo claro. Si la tinción es demasiado intensa, puede lavar el portaobjetos con agua corriente. Si la tinción se observa demasiado débil, sumerja el portaobjetos en etanol al 100%, déjelo secar y repita el proceso del paso 10. Para la tinción para microscopía de fluorescencia, póngase en contacto con el distribuidor autorizado.

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

13. Calcular el porcentaje de CCs con el ADN fragmentado. Dado que el número de células es limitado y depende de cómo se obtuvieron las CCs después de la denudación del ovocito, se aconseja contar todas las células observadas en el portaobjetos. Se recomienda contar un mínimo de 100 células.

Para ensayos futuros

Utilice tantos tubos Eppendorf (ET0.5 con agarosa alicuotada) como muestras de CCs se vayan a evaluar. Coloque los tubos Eppendorf (ET0.5) en el flotador y funda en un baño de agua (o un vaso de precipitados con agua en una placa calefactable) a 95-100 °C durante 5 minutos o hasta que se funda por completo. Alternativamente, si prefiere fundir la agarosa en un microondas, llene un vaso de precipitados con 100 ml de agua. A continuación, coloque los tubos Eppendorf (ET0.5) en 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. Continúe con el protocolo desde el paso 1.3.

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