Классификация сперматозоидов

Подсчитайте минимум 300 сперматозоидов на образец по следующим критериям:

- Сперматозоиды без фрагментации ДНК:
  - Сперматозоиды с большим ореолом (гало): те, у которых ширина гало равна или больше диаметра ядра (цифра 1 на рисунке).
  - Сперматозоиды с гало среднего размера: те, у которых размер гало находится в диапазоне от большого до очень малого гало (цифра 2 на рисунке).
- "другие": клеточные нуклеиды, которые не относятся к сперматозоидам. Одна из морфологических характеристик, по которой они идентифицируются – отсутствие хвостика. Эти клетки не должны включаться в оценку показателя фрагментации ДНК сперматозоидов.
- Сперматозоиды с фрагментированной ДНК:
  - Сперматозоиды с малым гало: ширина гало равна или меньше 1/3 диаметра ядра (цифра 3 на рисунке).
  - Сперматозоиды без гало: (цифра 4 на рисунке).
  - Сперматозоиды без гало и деградированные: те, у которых нет гало и ядро которых неравномерно или слабо окрашено (цифра 5 на рисунке).

Положительный и отрицательный контроли

Положительный контроль: все сперматозоиды наблюдаются с гало. Соблюдать инструкцию по применению, пропуская этап 7.

Отрицательный контроль: все сперматозоиды наблюдаются без гало. Соблюдать инструкцию по применению, пропуская этап 8.

Безопасность и охрана окружающей среды

- Следует соблюдать осторожность и не допускать контакта с кожей или глазами и предотвращать вдыхание. Кислотный раствор (DA) содержит хлористоводородную кислоту, а лизирующий раствор (LS) содержит дитиотреитол и тритон X-100. Для безопасного обращения следует работать в среде с воздухоудалением и соблюдать указания в Паспорте безопасности материала, составленном производителем.

-Нельзя выбрасывать использованные продукты в окружающую среду. Просим соблюдать специальный регламент безопасности вашей лаборатории в отношении хранения химических веществ и утилизации токсических продуктов, а также их воздействия.

Меры предосторожности

- Все образцы пациентов и реактивы должны рассматриваться как потенциально заразные, и при выполнении теста следует носить защитные перчатки, средство защиты глаз и лабораторный халат.
- После выполнения теста использованные материалы следует выбрасывать в надлежащий контейнер для биоопасных материалов.
- В зоне, где работают с образцами и реактивами набора, нельзя принимать пищу, напитки или курить.
- Нельзя использовать тест после истечения срока годности, указанного на этикетке упаковки.
- Рекомендуется использовать перчатки и лицевую маску.
- Паспорт безопасности материала доступен по запросу.

Условия хранения

После получения набор следует хранить при температуре от 2 ºC до 8 ºC.

После вскрытия набор стабилен в течение 9 месяцев.

!

ул. Фарадей 7, Парк Сиентифико де Мадрид / Эдифисио CLAID / Кампус де Кантобланко / 28049 Мадрид
Тел: + 34 91 279 69 50 / www.halotechdna.com / info@halotechdna.com

Version 08.1 / 2018

halotech®

halosperm® G2

Набор REF HT - HSG2
на 10 определений

	см. инструкцию по применению
REF	каталожный номер продукта
LOT	номер серии
	годен до
	производитель
IVD	изделие для лабораторной диагностики in vitro
Σ	содержит достаточно реагентов для проведения "n" тестов
2°C 8°C	ограничение температуры
	беречь от влаги
CE	

Набор halosperm® G2 был разработан компанией Halotech DNA с целью удовлетворения потребностей пользователей в тесте SCD (Дисперсия хроматина сперматозоидов) для оценки фрагментации ДНК сперматозоидов человека.

Принцип теста

Интактную нефиксированную сперму (свежие, замороженные/размороженные разведенные образцы) погружают в инертный агарозный микрогель на предварительно обработанном предметном стекле. Начальная кислотная обработка денатурирует ДНК в сперматозоидах с фрагментированной ДНК. После этого лизирующий раствор удаляет большинство ядерных белков. При наличии массивных разрывов ДНК нуклеоиды из сперматозоидов с фрагментированной ДНК либо не показывают ореола (гало) дисперсии, либо ореол (гало) минимальный. Диагностическая чувствительности и специфичность теста составляет 93 %. Данный тест является вспомогательным средством в диагностике. Интерпретация результатов проводится по медицинским критериям.

Описание реактивов набора

Каждый набор содержит необходимые компоненты для выполнения 10 анализов (определений). Компоненты:

- Агарозная подложка для клеток (ACS), 1 завинчивающаяся пробирка
- Предметные стекла с суперпокрытием (SCS), 10 штук
- Пробирки Эппендорфа (ETP), 10 штук
- Раствор 1 (DA) – Денатурирующий агент, один флакон-капельница, 10 мл
- Раствор 2 (LS) – Лизирующий раствор, один флакон-капельница, 10 мл
- Раствор 3 (SSA) – Раствор А для окрашивания эозином, один флакон-капельница, 10 мл
- Раствор 4 (SSB) – Раствор В для окрашивания тиазином, один флакон-капельница, 10 мл
- Плавающая опора

Требующиеся материалы и оборудование, не поставляемые с набором

Светлопольный или флуоресцентный микроскоп, холодильник (4 ºC), водяная баня для инкубации на 37 ºC и 95-100 ºC, перчатки, покровные стекла (24x24 мм), микропипетки, чашки Петри или аналогичный планшет, одноразовые пипетки, дистиллированная вода, этанол 70 % и 100 %. Микроволновая печь и вытяжной шкаф (использовать вытяжной шкаф рекомендуется, но не обязательно из-за низкой концентрации реактива). Убедитесь, что все оборудование откалибровано.

Образец спермы

Свежие образцы спермы следует собрать в стерильный контейнер. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов следует проводить сразу после получения образца спермы, или после размораживания образца после криоконсервации.

Инструкция по применению

1. Поместить завинчивающуюся пробирку с агарозой (ACS) в плавающую опору и расплавлять с помощью водяной бани (или помещением в колбу с водой на

1.1 нагревательной плите) при 95-100 ºC на протяжении 5 мин или пока агароза полностью не расплавится. Альтернативно, если предпочитаете расплавлять агарозу в микроволновой печи, налить 100 мл воды в колбу. Затем поместить слегка приоткрытую пробирку ACS с плавающей опорой в колбу и нагревать на максимальной мощности в течение 1,5 мин. Постоянно наблюдать, и прекратить процесс, как только вода начнет кипеть. Не давать кипеть ACS внутри микроволновой печи! Аликвотировать в 10 пробирок Эппендорфа (ET) по 100 мкл расплавленной агарозы. Сразу после этого держать пробирку Эппендорфа, которая будет использоваться в тесте, при 37 ºC в течение 5 минут для предотвращения застудневания (образования геля).

1.2 Остальные пробирки Эппендорфа, не используемые в данный момент, хранить в холодильнике вместе с набором.

1.3 Держать Растворы 1 и 2 при комнатной температуре (22 ºC) на протяжении всего процесса.

1.4 Приготовить и отобрать Предметные стекла с суперпокрытием (SDS), которые будут использоваться в тесте.

2.

Разбавить образец спермы подходящей средой для сперматозоидов человека или ФСБ до максимум 20 миллионов сперматозоидов на миллилитр.

3.

Сразу после этого перенести 50 мкл образца спермы в пробирку Эппендорфа и аккуратно перемешать микропипеткой. Не допускать образования пузырьков.

4.

Затем поместить каплю клеточной суспензии объемом 8 мкл на центр лунки образца («S»). Накрыть покровным стеклом. Осторожно прижать, не допуская образования воздушных пузырьков. Предметные стекла необходимо удерживать **в горизонтальном положении** на протяжении всего процесса. Использовать лунку «C» для обработки контрольного образца.

5.

Поместить предметное стекло на холодную поверхность (например, металлическую или стеклянную пластину, предварительно охлажденную до 4 ºC) и перенести в холодильник (при 4 ºC) на 5 минут для застывания агарозы.

6.

Вынуть предметное стекло из холодильника и снять покровное стекло, **осторожно его сдвинув.** Всю обработку следует выполнять при комнатной температуре (22 ºC).

7.

Поместить предметное стекло горизонтально, в приподнятом положении, как показано на рисунке, в чашку Петри или аналогичный планшет.

Нанести Раствор 1 (DA) на лунку, убедившись, **что она полностью покрыта реактивом на протяжении всего процесса**. Инкубировать в течение 7 минут. Затем удалить реактив, наклоняя предметное стекло, до его осушения, и поместить предметное стекло горизонтально в приподнятом положении, как показано на рисунке. **Очень важно удалить весь реактив без встряхивания. Рекомендуется выполнять удаление, наклоняя предметное стекло одним плавным непрерывным движением, позволяя жидкости стечь с него.**

8.

Нанести Раствор 2 (LS) на лунку, убедившись, что она полностью покрыта реактивом. Инкубировать в течение 20 минут. Затем удалить реактив, наклоняя предметное стекло, до его осушения, и поместить предметное стекло горизонтально в приподнятом положении, как показано на рисунке. **Очень важно удалить весь реактив без встряхивания. Рекомендуется выполнять удаление, наклоняя предметное стекло одним плавным непрерывным движением, позволяя жидкости стечь с него.**

9.

Промыть предметное стекло в течение 5 минут путем нанесения на слайд обильного количества дистиллированной воды с использованием одноразовой пипетки. Затем удалить реактив, наклоняя предметное стекло, до его осушения, и поместить предметное стекло горизонтально в приподнятом положении, как показано на рисунке. Дегидратировать, орошая 70 % этанолом, используя одноразовую пипетку, и инкубировать в течение 2 минут.

Слить, и нанести 100 % этанол на 2 минуты. Слить и дать слайду высохнуть горизонтально на фильтровальной бумаге или аналогичном изделии. После высыхания обработанные предметные стекла можно хранить в ящиках для предметных стекол при комнатной температуре в сухом и темном месте в течение нескольких месяцев.

10.

Поместить предметное стекло горизонтально в приподнятом положении на чашку Петри или аналогичный планшет. Нанести Раствор 3 (SSA) на лунки, убедившись, что они полностью заполнены. Инкубировать в течение 7 минут. Затем удалить краситель, наклоняя слайд, до его осушения, и поместить предметное стекло горизонтально в приподнятом положении

11.

Нанести Раствор 4 (SSB) на лунки, убедившись, что они полностью заполнены. Инкубировать в течение 7 минут. Затем удалить краситель, наклоняя предметное стекло. Удалить избыток красителя и дать высохнуть при комнатной температуре.

12.

Визуализировать с применением светлопольной микроскопии. Если окрашивание слишком насыщенное, предметное стекло может промыть в проточной воде. Если окрашивание слишком слабое, погрузить предметное стекло в 100 % этанол, дать высохнуть и повторить этапы 10 и 11. По вопросам окрашивания для флуоресцентной микроскопии следует связаться с уполномоченным дистрибьютором.

$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Фрагментир. + деградир.}}{\text{общее число подсчитанных сперматозоидов}} \times 100$$

13.

Рассчитать процентное содержание сперматозоидов с фрагментированной ДНК. Результаты следует оценивать с учетом клинических и лабораторных результатов, относящихся к образцу спермы.

Пороговое значение для показателя фрагментации ДНК спермы (SDF) было предложено Эвенсоном и соавт. (Evenson and Wixon, Reprod Biomed Online 12:466-472, 2006): высокая степень фрагментации - >30%.

Для будущих анализов

! Поместите столько пробирок Эппендорфа, сколько образцов спермы будет проанализировано, и начните протокол с пункта 1.2. Выполненные до этого действия: поместить завинчивающуюся пробирку с агарозой (ACS) в плавающую опору и расплавлять с помощью водяной бани (или путем помещения в лабораторную колбу с водой на нагревательной плите) при 95-100 ºC на протяжении 5 минут или пока агароза полностью не расплавится. Альтернативно, если вы предпочитаете расплавлять агарозу в микроволновой печи, налить 100 мл воды в лабораторную колбу. Затем поместить слегка приоткрытую пробирку ACS с плавающей опорой в лабораторную колбу и нагревать на максимальной мощности в течение 1,5 минут. Постоянно наблюдать, и прекратить процесс, как только вода начнет кипеть.

Не давать кипеть ACS внутри микроволновой печи!