

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 (*большое гало*).
- Сперматозоиды с гало среднего размера: те, у которых размер гало находится в диапазоне от большого до очень малого гало (*среднее гало*).

"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 (*малое гало*).
- Сперматозоиды без гало: (*без гало*).
- Сперматозоиды без гало и деградированные: те, у которых нет гало и ядро которых неравномерно или слабо окрашено (*деградированные*).

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 его следует хранить при температуре от 2 °C до 30 °C в защищенном от света месте.
После вскрытия набор стабилен в течение 12 месяцев.

halosperm® является торговой маркой компании halotech DNA, S.L.

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



halosperm®

Набор REF HT - HS10
на 10 определений



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

Принцип метода

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 нуклеотиды из сперматозоидов с фрагментированной ДНК либо не показывают ореола (гало) дисперсии, либо ореол (гало) минимальный. **Диагностическая чувствительности и специфичности 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:

- Предметные стекла с суперпокрытием (SDS), 10 штук
- Пробирки Эппендорфа с агарозой (ACS), 10 штук
- Денатурирующий агент (DA), один флакон с закрывающейся крышкой, 1 мл
- Лизирующий раствор (LS), один флакон, 110 мл
- Плавающая опора
- Инструкция по применению

Требуемые материалы и оборудование, не поставляемые с набором

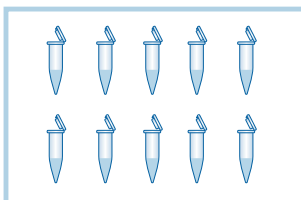
- Светлопольный микроскоп или флуоресцентный микроскоп, холодильник (4 °C), водяная баня для инкубации на 37 °C и 95-100 °C, перчатки, покровные стекла (24x24 мм), микропипетки, планшет (поддон) для инкубации (Halotech, HT-BAN) или аналогичный, одноразовые пипетки, дистиллированная вода, этанол 70 % и 100 %. Микроволновая печь и вытяжной шкаф.
- Рекомендуемый раствор для визуализации под микроскопом:
- Светлопольная микроскопия: раствор для окрашивания для светлопольной микроскопии
- Флуоресцентная микроскопия: флуорохромы для окрашивания ДНК. FluoRed (Halotech, HT-RF100) и FluoGreen (Halotech, HT-GF100).
- Фосфатный буферный раствор с pH 6,88 (Merck 1.07294.1000).
- Монтирующая среда Eukitt® (Panreac 253681).

Убедитесь, что все оборудование откалибровано.

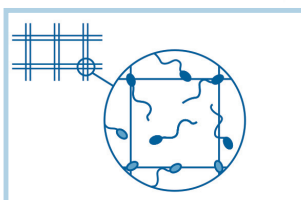
Образец спермы

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.

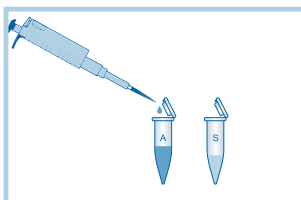
Инструкции по применению



1. Поместить пробирку Эппендорфа с агарозой (ACS) в плавающую опору и расплавить с помощью водяной бани (или путем помещения в лабораторную колбу с водой на нагревательной плите) при 95-100 °C 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 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!** Сразу после этого держать пробирку Эппендорфа при 37 °C 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 Лизирующий раствор держать при комнатной температуре (прибл. 22 °C) на протяжении всего процесса.
- 1.4 Приготовить и отобрать Предметные стекла с суперпокрытием (SDS), которые будут использоваться в тесте.



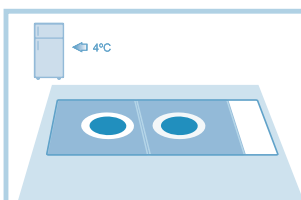
2. Разбавить образец спермы подходящей средой для сперматозоидов человека или ФСБ до максимум 20 миллионов сперматозоидов на миллилитр.



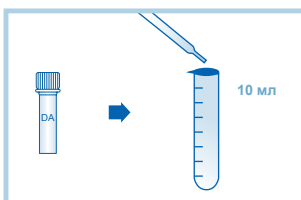
3. Сразу после этого перенести 50 мкл образца спермы в пробирку Эппендорфа (ACS) и аккуратно перемешать микропипеткой. Не допускать образования пузырьков.



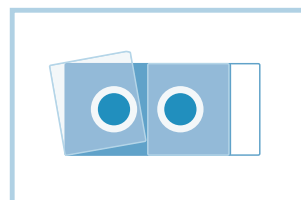
4. Затем поместить каплю клеточной суспензии объемом 8 мкл на центр лунки образца («S»). Накрыть покрывным стеклом. Осторожно прижать, не допуская образования воздушных пузырьков. Предметные стекла необходимо удерживать в **горизонтальном положении** на протяжении всего процесса. Использовать лунку «С»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



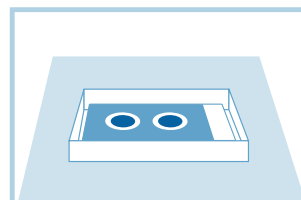
5. Поместить предметное стекло на холодную поверхность (например, металлическую или стеклянную пластину, предварительно охлажденную до 4 °C) и перенести в холодильник (при 4 °C) на 5 минут для застывания агарозы.



6. Приготовить раствор денатурирующего агента. Для этого добавить 80 мкл содержимого раствора для кислотной денатурации (DA) к 10 мл дистиллированной воды, перемешать и поместить в планшет для инкубации.

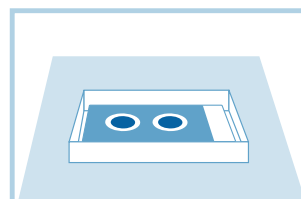


7. Вынуть предметное стекло из холодильника и снять покрывное стекло, осторожно его сдвинув. Всю обработку следует выполнять при комнатной температуре (прибл. 22 °C).



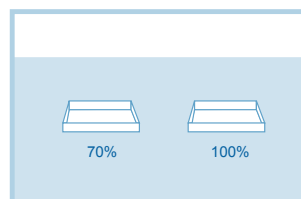
8. Незамедлительно погрузить предметное стекло в горизонтальном положении в раствор для кислотной денатурации из этапа 6, оставляя его на 7 минут для инкубации. **Не превышайте данное время инкубации!**

Убедитесь, что предметное стекло полностью покрыто реактивом на протяжении всего процесса.

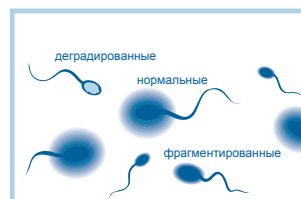


9. После этого поместить предметное стекло в другой планшет для инкубации, содержащий 10 мл выдержанного лизирующего раствора (LS). Инкубировать в течение 25 минут в горизонтальном положении.

10. Вынуть предметное стекло и установить горизонтально в планшет, содержащий обильное количество дистиллированной воды, чтобы смыть лизирующий раствор. Инкубировать на 5 минут.



11. Поднять предметно стекло и поместить его горизонтально в планшет с 70 % этанолом (на 2 минуты) и 100 % этанолом (на 2 минуты). Оставить сохнуть при комнатной температуре в горизонтальном положении на фильтровальной бумаге или аналогичном изделии. После высыхания обработанные предметные стекла можно хранить в архивных боксах при комнатной температуре, в темноте, в течение нескольких месяцев. После этого можно применить набор для окрашивания в соответствии с инструкциями поставщика.



12. Визуализировать с применением светопольной или флуоресцентной микроскопии. Если окрашивание слишком насыщенное, предметное стекло можно промыть в проточной воде. Если окрашивание слишком слабое, погрузить предметное стекло в 100 % этанол, дать высохнуть и повторить этап 10. По вопросам окрашивания для флуоресцентной микроскопии следует связаться с уполномоченным дистрибьютором.

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

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%.