



Protocolo **Vitality slides SCA**

EVALUACIÓN EN CAMPO CLARO DE LA VITALIDAD EN SEMEN HUMANO

Razón de ser del test: Este test ha sido desarrollado para medir dos aspectos funcionales del espermatozoide: el número real de espermatozoides vivos y la calidad/integridad de la membrana celular o, de otro modo, la habilidad de la membrana para soportar inflación osmótica sin explotar.

Para medir la vitalidad se usa BrightVit, una solución a base de nigrosina y eosina (NE) que tiñe de rosa por efecto de la eosina (tinte vital) las membranas de células muertas/ las membranas de las células en riesgo. Las células vivas permanecen blancas. La nigrosina sirve para teñir el fondo y crear contraste.

La solución BrightVit ha sido creada en un medio hipoosmótico y en consecuencia mide la hinchazón hipoosmótica. Las células / membranas de las células intactas se hincharán, pero las membranas de las células explotadas mostrarán colas rectas y no tendrán signos de hinchazón. Por tanto, no es sorprendente que haya una buena correlación entre células vivas (blancas- sin teñir) y espermatozoides hinchados.

Requisitos: tubos Eppendorf pequeños de 0.5mL, pipeta (2 a 50μL), puntas de pipeta y portaobjetos. Medio de montaje como DPX o Eukitt y cubreobjetos 20 x 50 x 0.13-0.16 mm, opcionalmente (para la conservación del portaobjetos).

Recomendaciones: Asegúrese de que todos los consumibles y soluciones están a (37°C) para evitar un shock térmico.

BrightVit permanece estable durante un año si se conserva en un lugar fresco y oscuro a una temperatura de <20°C.

Este kit contiene: 8mL de solución BrightVit y 200 Vitality slides SCA.

Procedimiento

Paso 1: Añada 40μL de solución BrightVit (NE) en un pequeño tubo Eppendorf (30 μL para concentraciones muy bajas, 1.5 M/ml o menos).

Paso 2: Pipetee 10μL de semen en el Eppendorf que contiene la solución BrightVit, mézclelo bien durante unos 15 a 20 segundos y déjelo unos 5-10 minutos a 37°C.

Paso 3: Ponga 20 μL de la mezcla de semen-BrightVit en el centro de un portaobjetos de vitalidad SCA. Ponga un portaobjetos normal horizontalmente sobre el portaobjetos que contiene la gota y deje que la mezcla de semen y tinción se distribuya sobre la superficie de ambos portaobjetos. Para muestras con una alta concentración de esperma (más de 10 millones de espermatozoides/ml) ponga una gota de la mezcla de semen y BrightVit de unos 10-15 μL. Para muestras con una concentración de esperma baja (menos de 4 millones espermatozoides/ml) use unos 20-25 μL de la mezcla de semen y BrightVit.

Paso 4: Desplace los portaobjetos en direcciones opuestas, obteniendo así 2 portaobjetos para analizar. Deje los portaobjetos a temperatura ambiente para que se sequen completamente al aire.

Se recomienda montar los portaobjetos con Eukitt, DPX o, cualquier otro medio sintético cuando se precise conservarlos. Una vez montados, ponga los portaobjetos en una caja oscura- la eosina es sensible a la luz y, si se deja varios días o semanas a luz, todos los espermatozoides se tiñen de rosa.

Paso 5: Analice el portaobjetos con el sistema SCA. Cuente, al menos, 200 espermatozoides, y si no se alcanza el número o hay algún problema en el primer portaobjetos, utilice el replicado.

Los espermatozoides blancos se cuentan como vivos; los rosas, muertos.

Expresé los resultados en porcentaje. Es importante que el % de vitalidad (células blancas vivas) sea igual o superior al % de movilidad.

Notas especiales: Con frecuencia la hiperviscosidad del semen es un problema en las clínicas de fertilidad. En estos casos, se recomienda encarecidamente lavar el semen con un medio convencional para lavar espermatozoides o incluso PBS (ex: Mezcle 200 μ L de muestra en fresco con 1 ml de PBS y centrifugue a 300g durante 10 minutos. Quite el sobrenadante y diluya el pellet con PBS para obtener una concentración de trabajo de 4 a 8 millones de espermatozoides/ml).

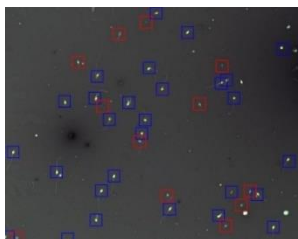


Fig. 1: Los cuadros rojos muestran los espermatozoides rosa-muertos; los azules, los vivos.

De igual modo, aspirar los especímenes viscosos con una jeringa Luer-lock, forzando su expulsión a través de una aguja G18, minimiza la viscosidad del plasma seminal.

Interpretación de los resultados

Límite inferior de referencia: Al menos un 54% de los espermatozoides deberían estar vivos con la tinción BrightVit (espermatozoides blancos con colas hinchadas).

La Fig.1 de esta página muestra la vitalidad analizada en modo automático: BrightVit, y la Fig. 2 a una mayor magnificación muestra todas las células blancas hinchadas- mostrando el test de hinchazón hipoosmótico (HOS). Estos test muy importantes para la FIV.



Fig. 2: Los espermatozoides blancos muestran hinchazón osmótica de las colas- normalmente dobladas hacia arañas en forma circular ya que, en este punto, contiene una gota de hinchazón. En cambio, los espermatozoides rosas tienen colas largas y delgadas- explotadas. Por tanto aquí el HOS = porcentaje de vitalidad.

Distribuido por:

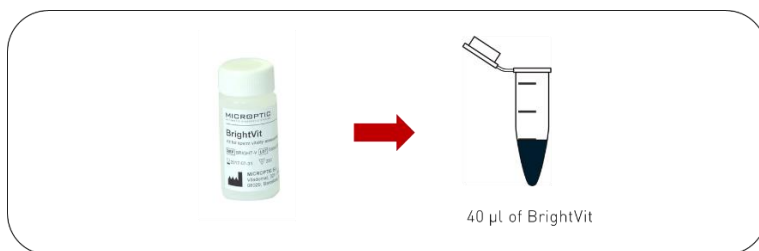
Microptic S.L.

Av. Josep Tarradellas, 8, 1º 6ª - 08029 Barcelona

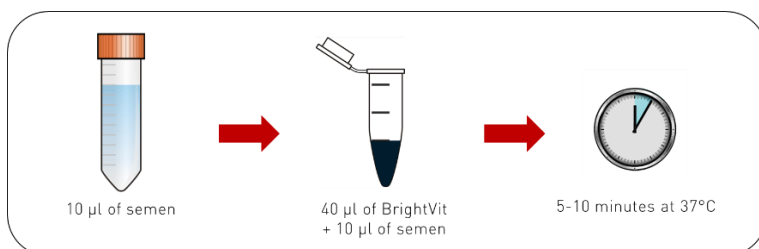
Phone: +34 93 419 29 10 Fax +34 93 419 94 26

www.micropticsl.com

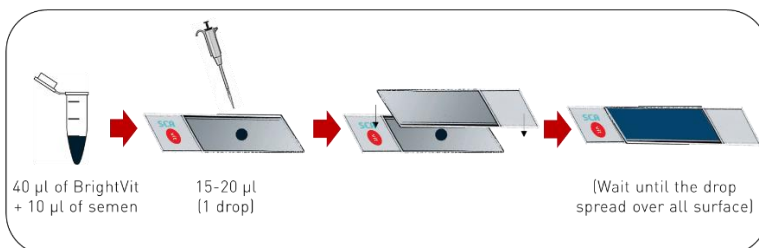
Paso 1:



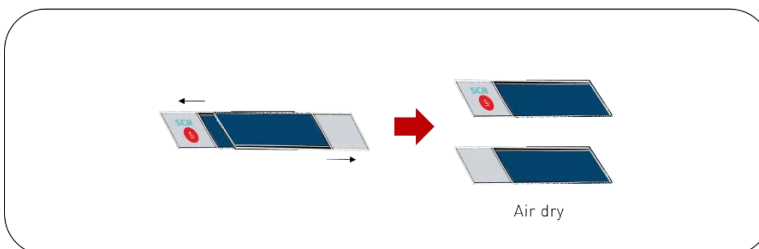
Paso 2:



Paso 3:



Paso 4:



Step 5: Analice con el sistema.