

# Spermac Stain

Método de coloração para espermatozoide humano  
Doc.ref.: FP09 I21 R01 C.8 -Atualização: 07/01/2019



Para uso de diagnóstico in vitro – Reagente reservado para uso profissional

## USO PRETENDIDO

Spermac Stain é um kit diagnóstico qualitativo para corar espermatozoides humanos. O objetivo de corar o espermatozoide é poder diferenciar os morfológicamente normais dos anormais.

## INFORMAÇÕES GERAIS

A definição e critérios de normalidade foram amplamente baseados em estudos feitos com espermatozoides recuperados do trato reprodutor feminino (especialmente do muco cervical pós coito) que são considerados normais. Mesmo assim, diferentes critérios foram propostos, sendo o principal o critério da OMS<sup>1</sup> e o critério de Tygerberg (ou rígidos)<sup>2,3</sup>.

Spermac Stain auxilia na avaliação morfológica e também na distinção das diferentes partes do espermatozoide (cabeça, acrossomo, região equatorial, peça intermediária, cauda), tornando mais fácil a diferenciação entre espermatozoides normais e anormais<sup>4,5</sup>.

Spermac Stain pode auxiliar no diagnóstico e manejo da infertilidade masculina.

## MATERIAL INCLUSO COM O TESTE

- Corante A: corante vermelho - 50ml ou 250ml
- Corante B: verde claro - 50ml ou 250ml
- Corante C: verde escuro - 50ml ou 250ml
- Fixador: fixador - 50ml ou 250ml
- O certificado de análise e MSDS estão disponíveis sob demanda ou podem ser baixados do nosso website ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

## MATERIAL NÃO INCLUSO COM O TESTE

Vidraria de laboratório, frascos de Coplin, microscópio (magnificação 1000x), óleo de imersão, placa aquecida a 37°C, água da pia ou destilada.

## ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Spermac Stain deve ser armazenado em frascos de Coplin fechados ou nos frascos originais a 2-25°C. Os reagentes se mantêm estáveis por 36 meses após a data de fabricação se não forem utilizados. Contudo, a coloração remove constituintes e adiciona contaminantes e, por isso, os corantes devem ser substituídos quando a coloração adequada não for mais atingida. Se for notado depósito, filtrar os corantes.

## MÉTODOS

É recomendável assistir ao vídeo demonstrativo (baixar via link em nosso website, ou escanear código):



## PREPARAÇÃO

Despejar reagentes no frasco de Coplin, se certificar de que o nível de fluido é alto o suficiente para cobrir a área que deve ser corada. Somente encher o frasco de fixação quando as lâminas estiverem preparadas, secas e prontas para a coloração. Encher o quinto frasco de Coplin, ou qualquer outro recipiente que possa conter uma objetiva, com água da pia (para lavar as lâminas entre as diferentes tinturas). Se a água da pia for alcalina (pH > 7), usar água destilada para a lavagem. Limpar, lavar em álcool e secar as lâminas antes do uso.

## AMOSTRA

O período de abstinência deve ser de 2-7 dias. Evitar a perda da primeira fração de sêmen que contém proporcionalmente o maior número de espermatozoides normais. Não esperar mais de 4 horas após ejaculação antes de começar o teste.

## PROCESSO DE COLORAÇÃO

1. Permitir que uma fina borda afilada com esfregaço de sêmen fresco, não diluído, preferencialmente liquefeito possa secar em ar ambiente, por, pelo menos, 5 minutos em uma placa aquecida a 37°C.  
Nota: Não fazer ou secar esfregaços próximo ao frasco aberto de fixador, já que o vapor do fixador (mesmo em baixas quantidades) interfere no processo de coloração. Manter o fixador fechado o maior tempo possível.
2. Fixar o esfregaço imergindo a lâmina por, no mínimo, 5 minutos em um frasco de Coplin contendo o fixador. Fixação mais longa é aceitável, porém não necessária.
3. Remover a lâmina do fixador, brevemente colocar verticalmente no papel absorvente para escoar o excesso de fixador. Não tocar a amostra com o papel. Deixar a lâmina secar colocando-a em uma placa aquecida a 37°C por 15 minutos. Enquanto isso, remover o frasco de Coplin com fixador da área de trabalho.
4. Lavar imergindo gentilmente 7 vezes na pia (pH<7) ou em água destilada. Se for corar lâminas em um berço com 5 ou mais lâminas, se assegurar de que o recipiente de lavagem é grande o suficiente para completar a lavagem do fixador das lâminas. Se o recipiente de lavagem for pequeno (ex. frasco de Coplin) repetir o processo de

lavagem com água fresca. Brevemente escoar o excesso de água encostando a borda da lâmina no papel absorvente.

5. Deixar corar por 2 minutos no corante A. Quando colocar a lâmina na solução corante, imergir lâmina lentamente 7 vezes (aproximadamente 1 mergulho por segundo) dentro e fora do corante, para garantir completo contato da amostra com o corante. Então deixar intocado o resto do período de coloração. Colocar verticalmente em papel absorvente. Lavar como indicado imergindo 7 vezes em água fresca da pia. Escoar brevemente o excesso de água em papel absorvente.
6. Repetir o processo de lavagem em água fresca. Esse processo de lavagem dupla após o corante A é importante. Escoar brevemente o excesso de água em papel absorvente.
7. Corar por um minuto no corante B. Imergir a lâmina 7 vezes inicialmente para garantir o contato completo do corante com a amostra. Colocar verticalmente em papel absorvente. Lavar como indicado em água fresca.
8. Corar por um minuto no corante C, imergindo inicialmente 7 vezes. Colocar verticalmente em papel absorvente. Lavar com água fresca como acima.
9. Deixar o esfregaço secar em ar ambiente.
10. Observar a coloração em microscópio (1000x) usando óleo de imersão.
  - acrossômio = verde escuro
  - núcleo = vermelho
  - região equatorial = verde claro
  - peça intermediária e cauda = verde

## INTERPRETAÇÃO

- Contar pelo menos 100 e preferencialmente 200 espermatozoides e classificá-los como normais ou anormais, especificando quais defeitos são os mais comuns
- Somente incluir células espermáticas identificáveis na contagem.
- O critério de classificação de células espermáticas como normais ou anormais depende do método de classificação usado no laboratório (OMS, 2010)
- De acordo com a OMS, usando os critérios de 2010 da OMS, uma amostra é considerada normal se, pelo menos, 4% dos espermatozoides demonstrarem formas normais<sup>1</sup>.

Pela aplicação rigorosa de alguns critérios de morfologia espermática, foram estabelecidas relações entre porcentagens de formas normais e vários objetivos de fertilidade (tempo para gestação, taxas de gestação in vivo e in vitro), o que pode ser útil para o prognóstico da fertilidade (OMS, 2010).

## MONTAGEM DAS LÂMINAS

Se as lâminas forem montadas, a coloração vai desbotar sob meio de montagem (após semanas). Logo, não montar lâminas se houver necessidade de revisá-las posteriormente. Gentilmente retirar o excesso de óleo de imersão, o qual pode também desbotar a coloração. É preferível fazer lâminas duplicadas ou fotografias ou gravação em vídeo para revisão futura, se preferível.

## AVISOS E PRECAUÇÕES

- Todas as amostras de sêmen devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Manusear todas as amostras como capazes de transmitir HIV ou hepatites.
- O fixador contém formaldeído: tóxico por inalação, em contato com a pele e se ingerido. Pode causar irritação a membranas mucosas. Listado como carcinogênico. Possíveis riscos de danos irreversíveis. Pode causar sensibilização por contato com a pele.
- Nenhum outro ingrediente foi comprovado tóxico.

## NOTAS DE USO

- Amostras proteínicas ou gelatinosas e amostras congeladas devem ser diluídas 1:1 com citrato de sódio a 3% antes de ser feito o esfregaço.
- Uma lâmina corada deve ser transparente, com um leve toque de tonalidade verde. Se a lâmina estiver verde escura, então essa lâmina foi exposta ao vapor do fixador antes da fixação.
- Para transporte antes da coloração, as lâminas devem ser preparadas, fixadas, lavadas e secas. Proteger contra abrasão durante o transporte. Quando prontas para corar, iniciar o processo pela fixação (segundo passo) ex. as lâminas recebem fixação dupla. Isso é importante, já que o fixador contém tampões que asseguram a coloração subsequente ocorra corretamente.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition, WHO, 2010
- <sup>2</sup> Menkveld R, Kruger TF (1991). Atlas of human morphology, Williams and Wilkins, Baltimore.
- <sup>3</sup> Menkveld R, Stander FSH (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, Human Reproduction 5(5): 286-92

<sup>4</sup> Oettlé EE(1986). An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state, Development, Growth and Differentiation (Suppl.): 28

<sup>5</sup> Chan PJ, Corselli JU, Jacobson JD, Patton WC, King A (1999). Spermac stain analysis of human sperm acrosomes. Fertility and Sterility 72 (1): 124-128.

#### **SUPORTE TÉCNICO**



FertiPro N.V.

Industriepark Noord 32,

8730 Beernem, Bélgica. <http://www.fertipro.com>