

Spermac Stain

Μέθοδος χρώσης για ανθρώπινα σπερματοζωάρια

Αναφορά εγγράφου: FP09 I21 R01 C.8 - Ενημέρωση: 07/01/2019

Για διαγνωστική χρήση *in vitro* - Αντιδραστήριο μόνο για επαγγελματική χρήση



ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η χρώση Spermac Stain είναι ένα kit ποιοτικής διάγνωσης για χρώση ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Ο σκοπός της χρώσης σπερματοζωαρίων είναι η ικανότητα διάκρισης των μορφολογικά φυσιολογικών από τα μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ο ορισμός και τα κριτήρια της φυσιολογικότητας είναι εν πολλοίς βασισμένα σε μελέτες που εξήχθησαν σε σπέρμα που ανακτήθηκε από το αναπαραγωγικό σύστημα γυναικών (ιδιαίτερα από βλέννη που έχει συλλεχθεί μετά από συνουσία) το οποίο θεωρείται φυσιολογικό. Έχουν προταθεί και διαφορετικά κριτήρια, τα βασικά από οποία είναι τα κριτήρια του ΠΟΥ¹ και τα κριτήρια Tygerberg (ή αυστηρά)^{2,3}.

Το Spermac Stain είναι ένα βοήθημα για την αξιολόγηση της μορφολογίας καθώς βοηθά στη διάκριση των διαφορετικών μερών του σπερματοζωαρίου (κεφαλή, ακρόσωμα, ισημερινός, μέσο τμήμα, ουρά), καθιστώντας ευκολότερη τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού σπερματοζωαρίου^{4,5}.

Το Spermac Stain μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση της διάγνωσης και της διαχείρισης της ανδρικής υπογονιμότητας.

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ

- Stain A: χρώση ερυθρού χρώματος - 50ml ή 250ml
- Stain B: χρώση αχνού πράσινου χρώματος - 50ml ή 250ml
- Stain C: χρώση σκούρου πράσινου χρώματος - 50ml ή 250ml
- Fix: διάλυμα μονιμοποίησης - 50ml ή 250ml
- Το πιστοποιητικό ανάλυσης και το ΔΔΑΥ είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος ή μπορούν να μεταφορτωθούν από τον ιστότοπό μας (www.fertipro.com).

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ

Υαλικά, δοχεία Corlin, μικροσκόπιο (1000x μεγέθυνση), έλαιο κατάδυσης, θερμαινόμενη πλάκα στους 37°C, νερό βρύσης ή αποσταγμένο.

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Το Spermac Stain θα πρέπει να φυλάσσεται σε κλειστά δοχεία Corlin ή στις αρχικές φιάλες στους 2-25°C. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά για 36 μήνες μετά από την ημερομηνία παραγωγής εάν δεν έχουν χρησιμοποιηθεί. Ωστόσο, η διαδικασία της χρώσης αφαιρεί συστατικά μέρη και εισάγει επιμολυντές. Ως εκ τούτου τα διαλύματα χρώσης θα πρέπει να αναπληρώνονται όταν δεν επιτυγχάνεται πλέον επαρκής χρώση. Υποβάλετε τα διαλύματα χρώσης σε διήθηση εάν παρατηρηθεί ίζημα.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Συνιστούμε να παρακολουθήσετε το βίντεο επίδειξης (μεταφορτώστε μέσω συνδέσμου από τον ιστότοπό μας, ή σαρώστε τον γραμμικό κώδικα):



ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Γεμίστε τα δοχεία Corlin με τα αντιδραστήρια επαρκώς ώστε να καλύπτονται τα προς χρώση πλακίδια. Γεμίστε το δοχείο μονιμοποίησης όταν έχουν προετοιμαστεί τα πλακίδια, έχουν στεγνώσει και είναι έτοιμα για χρώση. Γεμίστε ένα πέμπτο δοχείο Corlin ή οποιοδήποτε άλλο περιέκτη που μπορεί να δεχτεί ολόκληρο πλακίδιο με νερό βρύσης (για την έκπλυση των πλακιδίων μεταξύ των διαφορετικών διαλυμάτων χρώσης). Εάν το νερό βρύσης είναι αλκαλικό (pH > 7), χρησιμοποιήστε αποσταγμένο νερό για την έκπλυση. Καθαρίστε, εκπλύνετε σε αλκοόλη και στεγνώστε τα πλακίδια πριν από τη χρήση.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ

Το διάστημα αποχής από τη σεξουαλική πράξη θα πρέπει να είναι 2-7 ημέρες. Αποφύγετε την απώλεια του πρώτου σπερματικού κλάσματος καθώς περιέχει αναλογικά περισσότερα φυσιολογικά σπερματοζωάρια. Μην περιμένετε περισσότερο από 4 ώρες μετά από την εκσπερμάτιση για να αρχίσετε την εξέταση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΩΣΗΣ

1. Αφήστε ένα λεπτό επίχρισμα φρέσκου, μη αραιωμένου, κατά προτίμηση ρευστοποιημένου σπέρματος να στεγνώσει στον αέρα για περίπου 5 λεπτά σε θερμαινόμενη πλάκα στους 37°C.
Σημείωση: Μην ετοιμάσετε ή στεγνώσετε επιχρίσματα κοντά στην ανοικτή φιάλη του διαλύματος μονιμοποίησης, καθώς ο ατμός του (ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες) παρεμποδίζει τη χρώση. Διατηρήστε το διάλυμα μονιμοποίησης κλειστό για όσο είναι εφικτό.

2. Μονιμοποιήστε το επίχρισμα βυθίζοντας το πλακίδιο για τουλάχιστον 5 λεπτά σε ένα δοχείο Corlin που περιέχει το διάλυμα μονιμοποίησης. Η μεγαλύτερη σε διάρκεια μονιμοποίηση είναι αποδεκτή αλλά όχι απαραίτητη.
3. Αφαιρέστε το πλακίδιο από το διάλυμα μονιμοποίησης, τοποθετήστε για λίγο κάθετα σε απορροφητικό χαρτί για την αποστράγγιση του πλεονάζοντος διαλύματος μονιμοποίησης. Μην αγγίζετε το παρασκεύασμα με το χαρτί. Αφήστε το πλακίδιο να στεγνώσει τοποθετώντας το σε θερμαινόμενη πλάκα στους 37°C for 15 για 15 λεπτά. Εν τω μεταξύ, απομακρύνετε το δοχείο Corlin με το διάλυμα μονιμοποίησης από την περιοχή εργασίας.
4. Εκπλύνετε βυθίζοντας απαλά 7 φορές σε νερό βρύσης (pH<7) ή αποσταγμένο. Εάν τα προς χρώση πλακίδια τοποθετηθούν σε στατώ που περιέχει 5 ή περισσότερα πλακίδια, βεβαιωθείτε ότι ο περιέκτης για την έκπλυση είναι επαρκώς μεγάλος για πλήρη έκπλυση του διαλύματος μονιμοποίησης από τα πλακίδια. Εάν ο περιέκτης για την έκπλυση είναι μικρός (π.χ. δοχεία Corlin), επαναλάβετε τη διαδικασία έκπλυσης με φρέσκο νερό. Αποστραγγίστε γρήγορα το πλεονάζον νερό ακουμπώντας την άκρη του πλακιδίου σε απορροφητικό χαρτί.
5. Εκτελέστε τη χρώση για 2 λεπτά στο διάλυμα stain A. Όταν εισάγετε το πλακίδιο στο διάλυμα χρώσης, βυθίστε το πλακίδιο 7 φορές αργά (περίπου 1 κατάδυση ανά δευτερόλεπτο) μέσα και έξω από τη χρώση για να διασφαλίσετε την πλήρη επαφή του δείγματος με το διάλυμα χρώσης. Στη συνέχεια διατηρήστε το δείγμα στο διάλυμα χρώσης χωρίς παρεμβάσεις για το υπόλοιπο του χρόνου χρώσης. Τοποθετήστε κάθετα σε απορροφητικό χαρτί. Εκπλύνετε όπως παραπάνω βυθίζοντας 7 φορές σε φρέσκο νερό βρύσης. Αποστραγγίστε γρήγορα το πλεονάζον νερό σε απορροφητικό χαρτί.
6. Επαναλάβετε την έκπλυση σε φρέσκο νερό. Αυτό το βήμα διπλής έκπλυσης μετά από το διάλυμα Stain A είναι σημαντικό. Αποστραγγίστε γρήγορα το πλεονάζον νερό σε απορροφητικό χαρτί.
7. Εκτελέστε τη χρώση για 1 λεπτό στο διάλυμα stain B. Βυθίστε 7 φορές αρχικά για τη διασφάλιση της πλήρους επαφής του διαλύματος χρώσης με το παρασκεύασμα. Τοποθετήστε κάθετα σε απορροφητικό χαρτί. Εκπλύνετε όπως παραπάνω σε φρέσκο νερό.
8. Εκτελέστε τη χρώση για 1 λεπτό σε διάλυμα stain C, βυθίζοντας 7 φορές αρχικά. Τοποθετήστε κάθετα σε απορροφητικό χαρτί. Εκπλύνετε όπως παραπάνω σε φρέσκο νερό.
9. Αφήστε το επίχρισμα να στεγνώσει.
10. Παρατηρήστε με οπτικό μικροσκόπιο (1000x) χρησιμοποιώντας έλαιο κατάδυσης:
 - ακρόσωμα = σκούρο πράσινο
 - πυρήνας = ερυθρά χρώση
 - τμήμα ισημερινού = αχνό πράσινο
 - μέσο τμήμα και ουρά = πράσινο

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- Μετρήστε τουλάχιστον 100 και κατά προτίμηση 200 σπερματοζωάρια και κατηγοριοποιήστε τα ως φυσιολογικά ή μη φυσιολογικά, προσδιορίζοντας ποια ελαττώματα είναι τα πιο συχνά.
- Συμπεριλάβετε μόνο ταυτοποιημένα σπερματοζωάρια στη μέτρηση.
- Τα κριτήρια για την κατηγοριοποίηση των σπερματοζωαρίων σε φυσιολογικά και μη φυσιολογικά εξαρτώνται από τη μέθοδο κατηγοριοποίησης που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο (ΠΟΥ, 2010).
- Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του 2010, ένα δείγμα θεωρείται φυσιολογικό εάν τουλάχιστον 4% των σπερματοζωαρίων επιδεικνύουν φυσιολογικές μορφές¹.

Με την αυστηρή εφαρμογή ορισμένων κριτηρίων μορφολογίας σπερματοζωαρίων, έχουν καθορισθεί οι σχέσεις μεταξύ του ποσοστού των φυσιολογικών μορφών και διαφόρων καταληκτικών σημείων γονιμότητας (χρόνος μέχρι την κύηση, ποσοστά κύησης *in vivo* και *in vitro*), το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο για την πρόγνωση της γονιμότητας (ΠΟΥ, 2010).

ΣΤΕΡΕΩΣΗ ΠΛΑΚΙΔΙΩΝ

Εάν τα πλακίδια στερεωθούν η χρώση θα εξασθενίσει κάτω από το μέσο στερέωσης (μετά από εβδομάδες). Συνεπώς, μη στερεώσετε τα πλακίδια εάν επιθυμείτε να ανατρέξετε σε αυτά αργότερα. Απαλά σκουπίστε το έλαιο κατάδυσης, το οποίο επίσης συνεισφέρει στην εξασθένηση της χρώσης. Είναι προτιμώμενο να ετοιμάσετε διπλά πλακίδια για μελλοντική αναφορά εάν είναι απαραίτητο, ή αρχεία εικόνας ή βίντεο.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Όλα τα δείγματα σπέρματος θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμώδη. Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν HIV ή ηπατίτιδα.
- Το διάλυμα Fix περιέχει φορμαλδεΰδη: Τοξικό όταν εισπνέεται, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης. Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό σε βλεννογόνους μεμβράνες. Κατονομάζεται ως καρκινογόνο. Πιθανοί κίνδυνοι μη αναστρέψιμων επιπτώσεων. Μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση μετά από επαφή με το δέρμα.
- Όλα τα υπόλοιπα υλικά δεν έχουν καταδειχθεί ως τοξικά.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ

- Πρωτεϊνούχα ή ζελατινώδη δείγματα και κατεψυγμένα δείγματα πρέπει να αραιώνονται 1:1 με 3% κιτρικό νάτριο πριν από την ετοιμασία του επιχρίσματος.
- Ένα πλακίδιο μετά από χρώση θα πρέπει να είναι διαφανές με μόνο μια ελάχιστη ποσότητα πράσινης χροιάς. Εάν το πλακίδιο είναι σκούρο πράσινο, τότε το πλακίδιο εκτέθηκε σε ατμούς από το διάλυμα μονιμοποίησης πριν από τη μονιμοποίηση.
- Για μεταφορά πριν από τη χρώση, τα πλακίδια μπορεί να προετοιμαστούν, μονιμοποιηθούν, εκπλυθούν και στεγνώσουν. Προστατεύστε από τριβή κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Όταν είστε έτοιμοι για τη χρώση, αρχίστε τη διαδικασία με το βήμα μονιμοποίησης (βήμα 2), δηλαδή τα πλακίδια θα υποβληθούν σε διπλή μονιμοποίηση. Αυτό είναι σημαντικό καθώς το διάλυμα μονιμοποίησης περιέχει ρυθμιστικά διαλύματα που εξασφαλίζουν τη σωστή εκτέλεση μεταγενέστερων χρώσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

¹ WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition, WHO, 2010

² Menkveld R, Kruger TF (1991). Atlas of human morphology, Williams and Wilkins, Baltimore.

³ Menkveld R, Stander FSH (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, Human Reproduction 5(5): 286-92

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

⁵ 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.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Βέλγιο