

# Spermac Stain

Färbemethode für humane Spermien

Dokumentreferenz: FP09 I21 R01 C.8 – Aktualisierung: 07.01.2019

Zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum – Reagenzstoff nur für den professionellen Gebrauch



## VORGESEHENE VERWENDUNG

Spermac Stain ist ein Set zur qualitativen Diagnostik für das Färben von humanen Spermien. Zweck des Färbens der Spermien ist die Möglichkeit, zwischen morphologisch normalen und abnormalen Spermien zu unterscheiden.

## ALLGEMEINE INFORMATIONEN

Definition und Kriterien für die Normalität basieren weitgehend auf Studien als an normal beurteilten Spermien, die dem weiblichen Reproduktionstrakt (vor allem dem postkoitalen Zervixschleim) entnommen wurden. Es wurden jedoch auch andere Kriterien vorgeschlagen, vor allem die WHO-Kriterien<sup>1</sup> und die (strikten) Tygerberg-Kriterien<sup>2,3</sup>.

Spermac Stain ist ein Hilfsmittel zur Beurteilung der Morphologie, da es dabei hilft, die unterschiedlichen Teile der Samenzelle (Kopf, Akrosom, Äquatorialbereich, Mittelstück, Schwanz) zu erkennen, wodurch die Unterscheidung zwischen normalen und abnormalen Samenzellen erleichtert wird<sup>4,5</sup>.

Spermac Stain kann bei der Beurteilung der Diagnose und der Behandlung der männlichen Unfruchtbarkeit helfen.

## IM TEST ENTHALTENES MATERIAL

- Färbemittel A: Rot – 50 ml oder 250 ml
- Färbemittel B: Blassgrün – 50 ml oder 250 ml
- Färbemittel C: Dunkelgrün – 50 ml oder 250 ml
- Fix: Fixierlösung – 50 ml oder 250 ml
- Analysezertifikat und Material Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich oder können von unserer Webseite [www.fertipro.com](http://www.fertipro.com) heruntergeladen werden.

## NICHT IM TEST ENTHALTENES MATERIAL

Glasware, Coplin-Gläser, Mikroskop (1000-fache Vergrößerung), Immersionsöl, warme Platte mit 37 °C, Leitungswasser oder destilliertes Wasser.

## LAGERUNG UND STABILITÄT

Spermac Stain sollte bei 2 – 25 °C in verschlossenen Coplin-Gläsern oder in den Originalflaschen aufbewahrt werden. Die Reagenzstoffe sind 36 Monate nach dem Herstellungsdatum stabil, wenn sie nicht verwendet wurden. Bei der Färbung werden jedoch Bestandteile entfernt und Verunreinigungen hinzugefügt und aus diesem Grund sollten Färbemittel ersetzt werden, wenn eine angemessene Färbung nicht mehr erreicht wird. Bildet sich ein Bodensatz, muss das Färbemittel gefiltert werden.

## METHODE

Wir empfehlen, das Demonstrationsvideo anzusehen (kann über den Link auf unserer Website oder durch Scannen des Barcodes heruntergeladen werden):



## VORBEREITUNG

Die Färbemittel in Coplin-Gläser gießen und darauf achten, dass der Flüssigkeitsstand hoch genug ist, um den zu färbenden Bereich zu bedecken. Das Glas darf erst mit Fixiermittel gefüllt werden, nachdem die Objektträger vorbereitet, getrocknet und bereit für das Einfärben sind. Ein fünftes Coplin-Glas oder einen anderen Behälter, in den ein Objektträger vollkommen eingetaucht werden kann, mit Leitungswasser füllen (zum Waschen der Objektträger zwischen den einzelnen Färbeschritten). Ist das Leitungswasser alkalisch (pH-Wert > 7), sollte für das Waschen destilliertes Wasser verwendet werden. Die Objektträger müssen vor der Verwendung gereinigt, in Alkohol gewaschen und getrocknet werden.

## PROBENGEWINNUNG

Die sexuelle Abstinenz sollte 2 bis 7 Tage betragen. Den Verlust der ersten Samenfraktion vermeiden, da diese proportional mehr Spermien enthält. Nicht länger als 4 Stunden nach der Ejakulation bis zum Testbeginn verstreichen lassen.

## FÄRBEVORGANG

1. Lassen Sie einen dünnen Fahnenausstrich von frischem, nicht verdünntem, vorzugsweise verflüssigtem Sperma etwa 5 Minuten lang auf einer warmen Platte bei 37 °C trocknen.  
Anmerkung: Fertigen Sie Abstriche nicht in der Nähe der geöffneten Flasche mit Fixiermittel an oder trocknen sie dort, da die Fixiermitteldämpfe (auch in sehr geringen Mengen) die Färbung beeinträchtigen. Die Fixierlösung so lange wie möglich verschlossen halten.
2. Fixieren Sie den Abstrich, indem Sie den Objektträger mindestens 5 Minuten lang in ein Coplin-Glas mit Fixiermittel eintauchen. Eine längere Fixierung ist möglich, jedoch nicht erforderlich.
3. Entfernen Sie den Objektträger aus dem Fixiermittel und stellen Sie ihn kurz vertikal auf saugfähigem Papier ab, um überschüssiges Fixiermittel aufzunehmen. Berühren Sie die Probe nicht mit dem Papier. Lassen Sie den Objektträger 15 Minuten lang auf einer warmen Platte bei 37 °C trocknen. Inzwischen entfernen Sie das Coplingefäß mit dem Fixiermittel aus dem Arbeitsbereich.
4. Waschen Sie den Objektträger, indem Sie ihn vorsichtig 7 Mal in Leitungswasser (pH<7) oder destilliertes Wasser eintauchen. Werden 5 oder mehr Objektträger gleichzeitig in einer Halterung gefärbt, muss sichergestellt werden, dass der Waschbehälter groß genug ist, um ein vollständiges Abwaschen des Fixiermittels von den Objektträgern zu gewährleisten. Ist der Waschbehälter klein (z. B. Coplin-Glas), wiederholen Sie den Waschvorgang in einem weiteren Behälter mit frischem Wasser. Tippen Sie mit dem unteren Ende des Objektträgers kurz auf saugfähiges Papier, sodass überschüssiges Wasser aufgenommen wird.
5. Färben Sie 2 Minuten lang in Färbemittel A. Tauchen Sie den Objektträger dabei zunächst 7 Mal langsam (etwa 1 Mal pro Sekunde) in die Färbelösung, um einen vollständigen Kontakt der Probe mit dem Färbemittel zu gewährleisten. Lassen Sie den Objektträger dann den Rest der Färbedauer ruhen. Vertikal auf Löschpapier stellen. Waschen Sie ihn wie oben beschrieben, indem Sie ihn 7 Mal in frisches Leitungswasser eintauchen. Nehmen Sie überschüssiges Wasser mit saugfähigem Papier ab.
6. Wiederholen Sie den Waschvorgang in frischem Wasser. Dieser doppelte Waschvorgang nach Färbemittel A ist wichtig. Nehmen Sie überschüssiges Wasser mit saugfähigem Papier ab.
7. Färben Sie 1 Minute lang in Färbemittel B. Tauchen Sie den Objektträger dabei zunächst 7 Mal ein, um einen vollständigen Kontakt der Probe mit dem Färbemittel zu gewährleisten. Vertikal auf Löschpapier stellen. Waschen Sie ihn wie oben beschrieben in frischem Wasser.
8. Färben Sie 1 Minute lang in Färbemittel C und tauchen Sie den Objektträger dabei zunächst 7 Mal ein. Vertikal auf Löschpapier stellen. Waschen Sie ihn wie oben beschrieben in frischem Wasser.
9. Lassen Sie den Abstrich an der Luft trocknen.
10. Betrachten Sie die Färbung unter einem Lichtmikroskop (1000-fache Vergrößerung) unter Ölimmersion:
  - Akrosom = Dunkelgrün
  - Nukleus = Rotgefärbt
  - Äquatorialbereich = Blassgrün
  - Mittelstück und Schwanz = Grün

## INTERPRETATION

- Es müssen zumindest 100, vorzugsweise 200 Spermien gezählt und als normal bzw. abnormal klassifiziert werden, wobei angegeben wird, welche Defekte am häufigsten auftreten.
- In die Zählung dürfen nur identifizierbare Spermien eingeschlossen werden.
- Die Kriterien zur Klassifizierung von Spermien als normal oder abnormal hängt von der im Labor angewendeten Klassifizierungsmethode ab (WHO, 2010)
- Gemäß WHO wird bei Anwendung der WHO-Kriterien von 2010 eine Probe dann als normal angesehen, wenn zumindest 4 % der Spermien eine normale Form aufweisen<sup>1</sup>.

Gemäß der strikten Anwendung bestimmter Kriterien der Morphologie von Spermien wurden Beziehungen zwischen dem Prozentsatz der normalen Formen und unterschiedlichen Fertilitätspunkten (Zeit bis zur Schwangerschaft, Schwangerschaftsraten in vivo und in vitro) ermittelt, die zur Prognose der Fertilität hilfreich sein können (WHO, 2010).

## KONSERVIERUNG VON OBJEKTRÄGERN

Bei der Abdeckung von Objektträgern verblasst die Färbung unter dem Konservierungsmedium (im Lauf von einigen Wochen). Decken Sie Sie deshalb keine Objektträger ab, die Sie später erneut untersuchen möchten. Tupfen Sie das Immersionsöl vorsichtig ab, da

auch dies die Färbung verblassen lässt. Es wird empfohlen, für eine eventuelle spätere Untersuchung Duplikate der Objektträger bzw. Fotos oder Videoaufnahmen anzufertigen.

#### **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN**

- Alle Spermaproben sollten als potenziell infektiös betrachtet werden. Alle Proben sind daher so zu behandeln, als könnten sie HIV oder Hepatitis übertragen.
- Das Fixiermittel enthält Formaldehyd: Giftig beim Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Kann zu einer Reizung von Schleimhautmembranen führen. Als karzinogen gelistet. Potenzielles Risiko von irreversiblen Auswirkungen. Kann bei Hautkontakt zu einer Sensibilisierung führen.
- Alle weiteren Inhaltsstoffe sind nicht als toxisch gelistet.

#### **HINWEISE FÜR DEN GEBRAUCH**

- Eiweißhaltige oder gallertartige sowie gefrorene Proben müssen vor dem Ausstrich 1:1 mit 3% Natriumcitrat verdünnt werden.
- Eingefärbte Objektträger sollten transparent sein und nur eine zarte grünliche Hintergrundfärbung aufweisen. Ist der Objektträger dunkelgrün, wurde er vor dem Fixieren den Dämpfen des Fixiermittels ausgesetzt.
- Für den Transport vor dem Einfärben können Objektträger vorbereitet, fixiert, gewaschen und getrocknet werden. Beim Transport vor Abrieb schützen. Bevor mit dem Einfärben begonnen wird, muss nochmals fixiert werden (Schritt 2), d. h. die Objektträger werden doppelt fixiert. Das ist wichtig, weil das Fixiermittel Puffer enthält, die ein korrektes Einfärben gewährleisten.

#### **REFERENZEN**

- 1 WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5. Ausgabe, WHO, 2010
- 2 Menkveld R., Kruger T.F. (1991). Atlas of human morphology, Williams and Wilkins, Baltimore.
- 3 Menkveld R., Stander F.S.H. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, Human Reproduction 5(5): 286-92
- 4 Oettlé E.E. (1986). An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state, Development, Growth and Differentiation (Suppl.): 28
- 5 Chan P.J., Corselli J.U., Jacobson J.D., Patton W.C., King A. (1999). Spermac stain analysis of human sperm acrosomes. Fertility and Sterility 72 (1): 124-128.

#### **TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG**



FertiPro N.V.  
Industriepark Noord 32,  
8730 Beernem, Belgien. <http://www.fertipro.com>