

# Spermac Stain

Kleuring van humane spermatozoa

Doc.ref.: FP09 I21 R01 C.8 - Update: 07/01/2019

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik – Reagentia enkel voor professioneel gebruik



## BEOOGD GEBRUIK

Spermac Stain is een kwalitatieve diagnostische kit voor de kleuring van humane spermatozoa. Het doel van het kleuren van spermatozoa is om een onderscheid te kunnen maken tussen de morfologisch normale en abnormale spermacellen.

## ALGEMENE INFORMATIE

De definitie en criteria voor normale cellen zijn grotendeels gebaseerd op studies van spermastalen die verzameld zijn uit het vrouwelijke voortplantingsstelsel (voornamelijk van post coïtaal cervicaal mucus) dewelke als normaal worden beschouwd. Toch zijn er een aantal verschillende criteria voorgesteld, waaronder de belangrijkste, zijnde de WHO criteria<sup>1</sup>, en de Tygerberg (of strikte) criteria<sup>2,3</sup>.

Spermac Stain is een hulpmiddel bij het evalueren van de morfologie omdat het onderscheid kan maken tussen de verschillende delen van de spermacel (hoofd, acrosoom, equatoriale regio, middenstuk, staart), wat het gemakkelijker maakt om het verschil te zien tussen een normale en een abnormale spermacel<sup>4,5</sup>.

Spermac Stain kan helpen tijdens de diagnose en de behandeling van mannelijke onvruchtbaarheid.

## MATERIAAL AANWEZIG IN DE KIT

- Stain A: rood - 50ml of 250ml
- Stain B: lichtgroen - 50ml of 250ml
- Stain C: donkergroen - 50ml of 250ml
- Fix: fixatief - 50ml of 250ml
- Het certificaat van analyse en MSDS zijn beschikbaar op verzoek of kunnen gedownload worden van onze website ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

## MATERIAAL NIET AANWEZIG IN DE KIT

Glaswerk, Coplin kleurbakjes, microscoop (1000x vergroting), immersie olie, warmteplaat bij 37°C, kraantjes of gedistilleerd water.

## BEWAARCONDITIES EN STABILITEIT

Bewaar Spermac Stain bij 2-25°C in gesloten Coplin kleurbakjes of in de originele flessen. De reagentia zijn stabiel gedurende 36 maanden na productiedatum wanneer niet geopend. Tijdens kleuringen worden bestanddelen verwijderd en kunnen er zich verontreinigingen voordoen. Vervang bijgevolg de kleurstoffen wanneer een correcte kleuring niet langer bekomen wordt. Filter de kleurstoffen wanneer bezinking opgemerkt wordt.

## METHODE

We raden aan om onze demonstratie video te bekijken (download via link op onze website, of scan de barcode):



## VOORBEREIDING

Giet de reagentia in Coplin kleurbakjes, zorg ervoor dat het vloeistofniveau hoog genoeg is om het te kleuren gebied in onder te dompelen. Het fixatief wordt pas in het bakje gegoten wanneer de slides klaargemaakt, gedroogd en klaar zijn om te kleuren. Vul een vijfde Coplin kleurbakje of een ander recipiënt dat een volledig objectglasje kan bevatten, met kraantjeswater (om de slides te wassen tussen de verschillende kleurstoffen). Als het kraantjeswater alkalisch is (pH > 7), gebruik dan gedistilleerd water voor het wassen. Maak de slides proper, was ze in alcohol en laat ze drogen voor gebruik.

## SPECIMEN

De onthoudingsperiode zou 2-7 dagen moeten zijn. Vermijd het verlies van de eerste semenfractie aangezien deze proportioneel meer normaal sperma bevat. Wacht niet langer dan 4 uur na ejaculatie voordat de test wordt gestart.

## KLEURING PROCEDURE

1. Laat een dun uitstrijkje van vers, niet verdund, bij voorkeur vervloeid sperma opdrogen aan de lucht gedurende 5 minuten op een warmteplaat bij 37°C.  
Opmerking: Maak of droog geen uitstrijkjes dicht bij de geopende fixatief fles. De fixatieve damp interfereert (zelfs in zeer kleine hoeveelheden) met de kleuring. Houd de fixatief fles zo lang mogelijk gesloten.
2. Fixeer het uitstrijkje door de slide onder te dompelen voor minimum 5 minuten in een Coplin bakje met het fixatief. Langere fixatie is aanvaardbaar, maar niet nodig.
3. Verwijder de slide uit het fixatief, plaats de slide kortstondig verticaal op een absorberend papier om de overmaat aan fixatief te laten wegvloeien. Raak het specimen niet aan met het papier. Laat de slide drogen door het te plaatsen op een warmteplaat bij 37°C voor 15

minuten. Verwijder ondertussen het Coplin bakje met fixatief van de werkplaats.

4. Was door voorzichtig 7 keer in kraantjes-(pH<7) of gedistilleerd water onder te dompelen. Wanneer gebruik gemaakt wordt van een wasbakje met 5 of meer slides, moet je ervoor zorgen dat de wascontainer groot genoeg is om het fixatief volledig weg te wassen van de slides. Als de wascontainer klein is (vb. Coplin kleurbakje), herhaal dan de wasprocedure met vers water. Laat de overmaat aan water kortstondig afvloeien door met het einde van de slide een absorberend papier aan te raken.
5. Kleur 2 minuten in stain A. Dompel de slide 7 keer traag onder (zo'n 1 onderdompeling per seconde) in de oplossing, zodat je er zeker van bent dat het volledige staal contact maakt met de kleurstof. Laat vervolgens de slide staan voor de rest van de kleuringstijd. Plaats de slide verticaal op absorberend papier. Was zoals hierboven beschreven door 7 keer in vers kraantjeswater onder te dompelen. Laat de overmaat aan water kortstondig afvloeien door met het einde van de slide een absorberend papier aan te raken.
6. Herhaal de wasstap in vers water. Deze dubbele wasstap na Stain A is belangrijk. Laat de overmaat aan water kortstondig afvloeien op een absorberend papier.
7. Kleur 1 minuut in stain B. Dompel de slide initieel 7 keer onder om volledig contact van het specimen met de kleurstof te garanderen. Plaats de slide verticaal op absorberend papier. Was zoals hierboven beschreven met vers water.
8. Kleur 1 minuut in stain C, dompel initieel 7 keer onder. Plaats de slide verticaal op absorberend papier. Was zoals hierboven beschreven met vers water.
9. Laat het uitstrijkje drogen aan de lucht.
10. Analyseer de kleuring onder een lichtmicroscoop (1000x) gebruikmakend van een olie immersie:
  - acrosoom = donkergroen
  - nucleus = kleurt rood
  - equatoriale regio = licht groen
  - middenstuk en staart = groen

## INTERPRETATIE

- Tel ten minste 100 en bij voorkeur 200 spermatozoa en classificeer ze als normaal of abnormaal. Specificeer welke defecten het meest voorkomen.
- Neem enkel identificeerbare spermacellen op tijdens het tellen.
- De criteria voor het classificeren van spermacellen als normaal of abnormaal hangt af van de gebruikte classificatiemethode in het labo (WHO, 2010).
- Volgens de WHO, 2010 WHO criteria, wordt een staal als normaal beschouwd als ten minste 4% van de spermatozoa normale morfologie vertoont<sup>1</sup>.

Door een strikte toepassing van bepaalde sperma morfologie criteria werden verbanden tussen het percentage normale vormen en verscheidene fertilitateindpunten vastgesteld (tijd tot de zwangerschap, zwangerschapspercentage in vivo en in vitro), dewelke nuttig kunnen zijn voor de prognose van fertilitateit (WHO, 2010).

## AANBEVELINGEN VOOR LANGDURIG BEWAREN VAN SLIDES

We raden aan om het preparaat niet te behandelen met een insluitmiddel als deze moeten bewaard blijven voor latere verwijzing. (insluitmiddel kan de kleuring doen vervagen na enkele weken). Veeg de immersie olie voorzichtig af, want ook deze kan de kleuring doen vervagen. Maak bij voorkeur duplicaten wanneer later onderzoek nodig is of maak foto's of videobeelden.

## WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGEN

- Alle spermastalen zouden als mogelijks infectieus moeten worden beschouwd. Behandel alle specimens alsof ze HIV of hepatitis kunnen overdragen.
- Fixatief bevat formaldehyde: dit is toxisch bij inademing, bij huidcontact en bij inslikken. Kan irritatie veroorzaken aan de slijmvliezen. Opgelijst als carcinogeen. Mogelijke risico's of onomkeerbaar effect. Zou overgevoeligheid door huidcontact kunnen veroorzaken.
- Alle andere ingrediënten zijn niet geclassificeerd als toxisch.

## OPMERKINGEN BIJ GEBRUIK

- Proteïneachtige of gelatineuze stalen en bevroren stalen moeten 1:1 verdund worden met 3% natriumcitraat voor het uit te strijken.
- Een gekleurde slide zou transparant moeten zijn met enkel een zeer lichte groene tint. Als de slide donkergroen is, dan was de slide blootgesteld aan fixatieve dampen voor fixering.
- Slides kunnen voorbereid, gefixeerd, gewassen en gedroogd worden wanneer ze nog getransporteerd moeten worden vooraleer te kleuren. Bescherm tegen schuring tijdens transport. Wanneer ze klaar zijn voor de kleuring, start met het fixatief (Stap 2), om de slides een dubbele fixatie te geven. Dit is belangrijk want het fixatief bevat buffers die een correcte, volgende kleuring verzekeren.

## REFERENTIES

<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.

## TECHNISCHE ONDERSTEUNING



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