

Spermac Stain

Méthode de coloration des spermatozoïdes humains
Doc.ref: FP09 I21 R01 C.8 – Mise à jour: 07/01/2019

Usage diagnostic in vitro (DIV) - Réactif réservé à un usage professionnel.



UTILISATION

Spermac Stain est un kit de diagnostic qualitatif pour la coloration des spermatozoïdes humains. Colorer les spermatozoïdes permet de différencier les spermatozoïdes morphologiquement normaux des anormaux.

INFORMATION GENERALE

La définition et les critères de normalité ont été établis suite à des études menées sur le sperme issu du tractus féminin (spécialement du mucus cervical post coïtal) qui est considéré comme étant normal. Différents critères ont été proposés, les principaux étant les critères WHO¹ et les critères Tygerberg^{2,3}.

Spermac Stain est une aide dans l'étude de la morphologie car il permet de distinguer les différentes parties du spermatozoïde (tête, acrosome, post acrosome, pièce intermédiaire et flagelle) rendant plus facile de différencier le spermatozoïde normal du spermatozoïde anormal^{4,5}. Spermac Stain peut aider à évaluer le diagnostic et le traitement de l'infertilité masculine.

MATERIEL INCLUS DANS LE KIT

- Colorant A : colorant rouge – 50ml ou 250 ml
- Colorant B : vert pâle – 50ml ou 250 ml
- Colorant C : vert foncé – 50 ml ou 250ml
- Fixateur : 50 ml ou 250ml

Le certificat d'analyse et la fiche de données de sécurité sont disponibles sur demande ou peuvent être téléchargés sur notre site internet (www.fertipro.com).

MATERIEL NON INCLUS DANS LE KIT

Lames, bocal de Coplin, microscope (1000x magnification), huile à immersion, plateau chauffant à 37°C, eau distillée

CONSERVATION ET STABILITE

Spermac Stain doit être conservé dans des bocaux de Coplin ou dans les bouteilles d'origine entre 2 et 25°C. Les réactifs sont stables pendant 36 mois après la date de fabrication s'ils ne sont pas utilisés. Cependant l'utilisation du colorant supprime les constituants et introduit des contaminants et donc les réactifs doivent être remplacés quand la coloration appropriée n'est plus obtenue. Filtrer les colorants s'il y a présence de dépôt.

METHODE

Nous recommandons de regarder notre vidéo de démonstration (télécharger par le lien sur notre site Internet, où scanner le code-barres):



PREPARATION

Verser les réactifs dans des bocaux de Coplin. Assurez-vous que le niveau soit suffisamment élevé pour recouvrir la zone à colorer.

Ne remplir le bocal de fixateur que lorsque les lames ont été préparées, séchées et sont prêtes pour la coloration. Remplir un cinquième bocal de Coplin ou tout autre récipient qui peut contenir une lame complète avec de l'eau (pour le lavage des lames entre les différentes Teintes). Si l'eau est alcaline (ph > 7) utiliser de l'eau distillée pour le lavage. Nettoyer, laver à l'alcool et sécher les lames avant utilisation.

PRELEVEMENT

La période d'abstinence devrait être 2 à 7 jours. Évitez la perte de la première fraction de sperme car celle-ci contient proportionnellement plus de spermatozoïdes normaux. N'attendez pas plus de 4 heures après l'éjaculation pour commencer le test.

METHODE

1. Laisser sécher à l'air une fine couche de sperme frais, non dilué et de préférence liquéfié, pendant environ 5 minutes sur un plateau chauffant à 37°C.
Remarque: ne pas manipuler ou sécher les échantillons à proximité de la bouteille de fixateur ouverte étant donné que les vapeurs (même en très petite quantité) interfèrent avec le colorant. Garder le fixatif fermé le plus longtemps possible.
2. Fixer l'échantillon en immergeant la lame au minimum 5 minutes dans un bocal de Coplin contenant le fixateur. Une durée de fixation plus longue est acceptable mais pas nécessaire.
3. Oter la lame du fixateur, la placer brièvement et verticalement sur un papier absorbant pour éliminer l'excès de fixateur. Ne pas toucher l'échantillon avec le papier. Laisser sécher la lame pendant 15 minutes sur un plateau chauffant à 37°C. Pendant ce temps, retirez le récipient Coplin avec le fixatif de la zone de travail.
4. Laver en plongeant doucement 7 fois dans de l'eau (pH<7) ou de l'eau distillée. Si le récipient de coloration contient 5 lames ou plus, assurez-vous que le récipient de lavage est suffisamment grand pour permettre

un lavage complet du fixateur sur les lames. Si le récipient de lavage est petit (bocal de Coplin), répétez la procédure de lavage avec de l'eau fraîche. Brièvement ôter l'excès d'eau en posant l'extrémité de la lame sur un papier absorbant.

5. Colorer 2 minutes dans le réactif A. Plonger et retirer lentement la lame 7 fois (environ 1 fois par seconde) du colorant pour assurer un contact complet de l'échantillon avec le réactif. Laisser reposer pendant la durée de la coloration. Placer verticalement sur du papier absorbant. Laver comme mentionné au dessus en trempant 7 fois dans une nouvelle eau. Oter brièvement l'excès d'eau sur le papier absorbant.
6. Répétez le lavage dans une nouvelle eau, ce double lavage après la coloration A est important. Brièvement ôter l'excès d'eau sur du papier absorbant.
7. Colorer une minute dans le réactif B. Plonger la lame 7 fois pour assurer un contact complet du colorant avec l'échantillon. Placer verticalement sur du papier absorbant. Laver comme indiqué ci-dessus avec de l'eau nouvelle.
8. Colorer une minute dans le réactif C en trempant 7 fois la lame comme initialement. Placer verticalement sur du papier absorbant et laver dans une nouvelle eau.
9. Laisser sécher à l'air.
10. Observer la coloration au microscope (1000x) en utilisant de l'huile à immersion :
 - Acrosome = vert foncé
 - Noyau = rouge
 - Région équatoriale = vert pâle
 - Pièce intermédiaire et flagelle = vert

INTERPRETATION DES RESULTATS

- Compter au moins 100 et de préférence 200 spermatozoïdes et classez les comme normaux et anormaux en spécifiant quel défaut est le plus fréquent
- Inclure uniquement les spermatozoïdes identifiables dans le comptage
- La classification des spermatozoïdes dépend de la méthode utilisée par le laboratoire (WHO, 2010)
- Selon le WHO, en utilisant les critères WHO 2010, un échantillon est considéré comme normal si au moins 4% des spermatozoïdes présentent des formes normales¹

Par la stricte application de certains critères de morphologie du sperme, une relation entre le pourcentage de formes normales et divers paramètres de fertilité (durée pour parvenir à une grossesse, taux de grossesse in vivo et in vitro) ont été établis, ce qui peut s'avérer utile pour le pronostic de la fertilité (WHO, 2010).

MISE EN GARDE ET PRECAUTIONS

- Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Les manipuler en tenant compte du risque potentiel de transmission de l'hépatite et du virus HIV.
- Le fixateur contient du Formaldéhyde: toxique par inhalation, par contact avec la peau et par absorption. Il peut causer des irritations des muqueuses. Listé comme cancérigène. Risques possibles d'effets irréversibles. Peut causer une allergie par contact avec la peau.
- Tous les autres composants n'ont pas été classés comme toxiques. La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.

REMARQUES SUR L'UTILISATION

- Des échantillons congelés, gélatineux ou protéagineux doivent être dilués 1:1 avec 3% de citrate de sodium avant l'étalement.
- Une lame colorée doit être transparente avec seulement une petite nuance de couleur verte. Si la lame est vert foncé, alors celle-ci a été exposée à des vapeurs de fixateur.
- Pour le transport avant la coloration, les lames doivent être préparées, fixées, lavées et séchées. Les protéger contre l'abrasion durant le transport. Lorsqu'elles sont prêtes à être colorées, commencer la procédure par la fixation (étape 2) de manière à ce que les lames reçoivent une double fixation. Ceci est important puisque le fixateur contient un tampon qui assure une coloration postérieure correcte.

REFERENCES

1. Manuel de laboratoire, WHO pour l'examen du sperme humain, 5^{ème} édition, WHO, 2010
2. Menkveld R, Kruger TF, et al, Atlas of human morphology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1991
3. Menkveld R, Stander FSH, et al, The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, Human Reproduction, 1990 : 5,5,pp. 286-92
4. Oettlé EE, An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state, Development, Growth and Differentiation (Suppl), 1986, p28
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.

SUPPORT TECHNIQUE



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