

# Spermac Stain

Kit de colorants pour spermatozoïdes humains

Réf. du doc. : FP09 I21 R01 D.2 - Mise à jour : 31/01/2024

Réactifs pour diagnostic *in vitro*, à usage professionnel uniquement



## INFORMATIONS GENERALES

L'analyse de la morphologie des spermatozoïdes est l'un des examens de base du sperme effectués dans le diagnostic et la gestion de l'infertilité masculine. Spermac Stain est un kit de colorants pour diagnostic *in vitro* composé d'un fixateur et de 3 solutions de coloration pour spermatozoïdes humains. La coloration facilite la distinction entre les spermatozoïdes morphologiquement normaux et anormaux et améliore la visualisation des différentes parties du spermatozoïde (tête, acrosome, région équatoriale, pièce médiane, queue) <sup>1,2</sup>.

## UTILISATION PREVUE

Spermac Stain est un kit de diagnostic qualitatif non automatisé à usage professionnel servant à la coloration des spermatozoïdes humains. La coloration des spermatozoïdes vise à faciliter la différenciation entre les spermatozoïdes morphologiquement normaux et les spermatozoïdes morphologiquement anormaux. Le résultat de cette évaluation peut aider à évaluer le diagnostic et la prise en charge de l'infertilité masculine.

## MATERIEL INCLUS DANS LE KIT

Spermac Stain

Code produit :	SPS050	SPS250
Colorant A: Colorant rouge	50 ml	250 ml
Colorant B: Colorant vert pâle	50 ml	250 ml
Colorant C: Colorant vert foncé	50 ml	250 ml
Fix: Fixateur	50 ml	250 ml

Le certificat d'analyse et une fiche de données de sécurité sont disponibles sur demande ou peuvent être téléchargés sur notre site Internet ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

## MATERIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Lames de microscope
- 5 jarres Coplin
- Microscope (grossissement 1000x)
- Huile d'immersion
- Plaque chaude (37 °C)
- Eau du robinet ou distillée

## METHODE

Scanner le code-barres (ou suivre le lien sur [www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)) pour visionner la vidéo de démonstration.



## PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Des récipients standard de collecte de sperme doivent être utilisés, lorsque l'échantillon de sperme est recueilli par masturbation. Ils sont généralement fabriqués en polypropylène et soumis à des tests de survie/motilité des spermatozoïdes. Des préservatifs en plastique non toxique pour les spermatozoïdes doivent être utilisés lorsqu'une collecte de sperme par masturbation n'est pas possible. Conserver le récipient de collecte de sperme à température ambiante avant d'y ajouter l'échantillon de sperme afin d'éviter toute variation importante de température susceptible d'affecter les spermatozoïdes.

La période d'abstinence doit être de 2 à 7 jours. Éviter la perte de la première fraction de sperme, car celle-ci contient proportionnellement plus de spermatozoïdes normaux. Ne pas attendre plus de 4 heures après l'éjaculation avant de commencer le test.

## PREPARATION DU REACTIF

1. Verser les colorants A, B et C dans des jarres Coplin séparées, veiller à ce que le niveau de liquide soit suffisamment élevé pour couvrir la zone à colorer.
2. Remplir une jarre Coplin ou une station avec de l'eau du robinet pour les étapes de lavage (voir la Remarque 1)
3. Préparer les lames de verre : les nettoyer, les laver à l'alcool et les laisser sécher
4. Garder la bouteille de réactif fixateur fermée ! (voir la Remarque 2)

*Remarque 1 : utiliser de l'eau distillée si l'eau du robinet est alcaline (pH > 7). En cas d'utilisation d'une station permettant d'examiner une association de plusieurs lames, veiller à ce que cette station soit suffisamment grande pour pouvoir effectuer un lavage complet.*

*Remarque 2 : Les vapeurs de fixateur, même en petites quantités, interfèrent avec la coloration.*

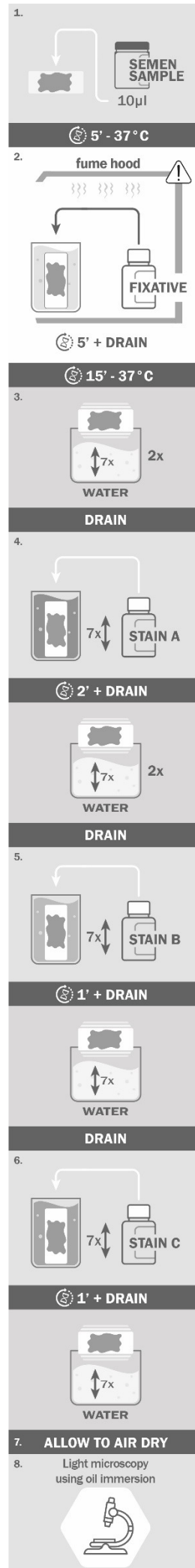
## PROCEDURE DE COLORATION

1. Bien mélanger le sperme pour obtenir un échantillon homogène et préparer un frottis mince en stries de sperme non dilué, de préférence liquéfié, sur une lame de verre (c'est-à-dire 10 µl de sperme). Laisser le frottis sécher à l'air libre environ 5 minutes sur une plaque chaude à 37 °C.
2. Une fois le frottis sec, verser le fixateur dans une jarre. Effectuer chaque manipulation avec le fixateur **sous une hotte aspirante** !
  - a. Fixer le frottis en immergeant la lame au moins 5 minutes dans la jarre de fixateur. Une fixation plus longue est acceptable, mais pas nécessaire.
  - b. Retirer la lame de la jarre de fixateur, la placer brièvement à la verticale sur du papier absorbant pour drainer l'excès de liquide. Ne pas toucher l'échantillon avec le papier.
  - c. Laisser la lame sécher en la plaçant 15 minutes sur une plaque chaude à 37 °C. Pendant ce temps, retirer la jarre Coplin avec fixateur de la zone de travail.
3. Laver en trempant doucement 7 fois dans la jarre d'eau (consulter la Remarque 1 ci-dessus). Si nécessaire (p. ex. en cas d'utilisation d'une petite jarre Coplin), répéter la procédure de lavage avec de l'eau douce pour garantir un lavage complet. Égoutter brièvement l'excès d'eau en mettant en contact l'extrémité de la lame sur du papier absorbant.
4. Tremper lentement la lame 7 fois en effectuant des va-et-vient dans le Colorant A (consulter la Remarque 3). Laisser ensuite reposer 2 minutes dans la jarre. Placer ensuite à la verticale sur du papier absorbant. Laver avec de l'eau fraîche et égoutter comme précisé dans l'étape 3. Recommencer le lavage avec de l'eau fraîche. **Un double lavage après application du Colorant A est important.**
5. Tremper la lame 7 fois en effectuant des va-et-vient dans le Colorant B et laisser reposer 1 minute dans la jarre. Placer ensuite à la verticale sur du papier absorbant. Laver avec de l'eau fraîche et égoutter comme précisé dans l'étape 3.
6. Tremper la lame 7 fois en effectuant des va-et-vient dans le Colorant C et laisser reposer 1 minute dans la jarre. Placer ensuite à la verticale sur du papier absorbant. Laver avec de l'eau fraîche et égoutter comme précisé dans l'étape 3.
7. Laisser la lame sécher à l'air libre.
8. Observer la lame sous un microscope optique (1000 x) via immersion sous un film d'huile.

*Remarque 3 : « lentement » signifie : environ 1 trempage par seconde. Le trempage est important, car il permet de mettre entièrement en contact l'échantillon et le colorant.*

## INTERPRETATION

- acrosome = vert foncé
  - noyau = rouge teinté
  - région équatoriale = vert pâle
  - pièce médiane et queue = vert
- Compter au moins 100 et de préférence 200 spermatozoïdes et les classer comme normaux ou anormaux, en précisant les défauts les plus courants.



- Ne compter que les spermatozoïdes identifiables.
- Conformément aux critères de 2021 de l'OMS, un échantillon est considéré comme normal si au moins 4 % des spermatozoïdes présentent des formes normales<sup>3</sup>.

Grâce à une application stricte de certains critères de morphologie des spermatozoïdes, des relations entre le pourcentage de formes normales et différents paramètres de fertilité (délai jusqu'à la grossesse, taux de grossesse in vivo et in vitro) ont été établies, et peuvent être utiles pour établir le pronostic de la fertilité<sup>3</sup>.

#### REMARQUES RELATIVES A L'UTILISATION

- Les échantillons protéiques ou gélatineux et les échantillons congelés doivent être dilués à un rapport de 1:1 avec du citrate de sodium à 3 % avant de réaliser le frottis.
- Une lame colorée doit être transparente avec uniquement une très légère touche de teinte verte. Si la lame est vert foncé, cela signifie que la lame a été exposée à des vapeurs de fixateur avant la fixation.
- Pour le transport avant la coloration, les lames peuvent être préparées, traitées au fixateur, lavées et séchées. Protection contre l'abrasion pendant le transport. Une fois prêt à débiter la coloration, commencer le processus au niveau du fixateur (étape 2), les lames subissent donc une double fixation. Ceci est important car le fixateur contient des tampons qui garantissent que la coloration ultérieure se produira correctement.

#### LAMES DE MONTAGE

La coloration s'estompera sous le milieu de montage (après plusieurs semaines). Par conséquent, il ne faut pas préparer de lames si l'on souhaite les utiliser ultérieurement comme référence. Éponger doucement l'huile d'immersion, ce qui provoque également une décoloration. Il est préférable de préparer des lames en double pour référence future si nécessaire, ou des enregistrements photographiques et/ou vidéo.

#### LIMITES DE LA METHODE











- Les spermatozoïdes colorés avec Spermac Stain ne peuvent être utilisés pour aucune autre procédure.

#### STOCKAGE/ELIMINATION ET STABILITE

- Spermac Stain doit être conservé dans des jarres Coplin fermées ou dans les flacons d'origine entre 2 et 25 °C.
- Convient pour un transport ou stockage à court terme à des températures élevées (jusqu'à 5 jours à 37 °C).
- Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Ne pas utiliser après la date d'expiration.
- Cependant, la coloration élimine les constituants et introduit des contaminants, les colorants doivent par conséquent être remplacés si une coloration adéquate ne peut plus être obtenue.
- Filtrer les colorations en présence de dépôts.
- Les réactifs doivent être éliminés conformément aux réglementations locales relatives à l'élimination des dispositifs médicaux.
- Le nombre de tests pouvant être effectués avec un kit Spermac Stain est difficile à déterminer, car les colorants peuvent être réutilisés.

#### MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

#### GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Symboles tels que définis dans la norme ISO 15223			
	Référence catalogue		Numéro de lot
	Consulter les instructions d'utilisation		Fabricant
	Diagnostics in vitro		Limite de température
	Date de péremption		
Symbole tel que défini dans la norme IVDR 2017/746			
	Marquage CE		
Symbole tel que défini dans le Règlement (CE) n° 1272/2008 [CLP]			
	GHS07 : Danger pour la santé : peut provoquer une allergie cutanée		GHS08 : Danger pour la santé : suspecté d'induire des anomalies génétiques, peut provoquer le cancer

- Toute matière organique humaine doit être considérée comme potentiellement infectieuse. Manipuler tous les spécimens comme s'ils étaient susceptibles de transmettre le VIH ou l'hépatite. Il convient de toujours porter des vêtements de protection lors de la manipulation des échantillons et des réactifs (gants, blouse de laboratoire, protection pour les yeux ou le visage).
- Fix : contient du paraformaldéhyde ; peut provoquer une réaction allergique cutanée ; provoque une grave irritation des yeux ; suspecté de provoquer le cancer.
- En raison de la toxicité liée à l'inhalation de paraformaldéhyde, les étapes nécessitant le fixateur doivent être effectuées sous une hotte aspirante.
- Colorant A et Colorant B : liquide et vapeur hautement inflammables
- Les colorants contiennent des substances identifiées comme mutagènes. Cependant, la concentration de ces substances dans le réactif final étant faible, les colorants eux-mêmes ne sont pas identifiés comme mutagènes.
- Le kit ne contient aucun perturbateur endocrinien.

#### RÉFÉRENCES

<sup>1</sup> Oettlé EE(1986). An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state, Development, Growth and Differentiation (Suppl.): 28

<sup>2</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.

<sup>3</sup> Geneva: World Health Organization. 2021. 'WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen', sixth edition.

#### SUPPORT CLIENTS-SUPPORT TECHNIQUE



FertiPro NV  
 Industriepark Noord 32  
 8730 Beernem – Belgique  
 Tél. + 32 (0)50 79 18 05  
 Fax. + 32 (0)50 79 17 99  
 E-mail : [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)  
 URL : <http://www.fertipro.com>



GHS02 : Inflammable : liquide et vapeur  
hautement inflammables

