

# Spermac Stain

Реагенты для окрашивания сперматозоидов человека

---

Документ №: FP09 I21 R01 C.8

Дата издания: 07.01.2019 г.

ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

## **СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Spermac Stain представляет собой качественный диагностический набор для окрашивания сперматозоидов человека. Окрашивание сперматозоидов предназначено для обеспечения дифференцирования морфологически нормальных от аномальных сперматозоидов.

## **ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Определение и критерии нормальности по большей части основаны на исследованиях, проведенных на сперматозоидах, полученных из репродуктивного тракта женщин (особенно в посткоитальной цервикальной слизи), которые определены как нормальные. Тем не менее, были предложены иные критерии, из которых основными являются критерии ВОЗ (1) и критерии Тигерберга (или строгие критерии) (2, 3).

Набор Spermac Stain позволяет оценить морфологию, поскольку он помогает различить различные части сперматозоида (голова, акросома, экваториальный сегмент, средняя часть и хвост), облегчая дифференцирование нормального сперматозоида от аномального. Набор Spermac Stain может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

## **МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР**

- Краситель А: красный краситель – 50 мл или 250 мл
- Краситель Б: бледно-зеленый краситель – 50 мл или 250 мл
- Краситель С: темно-зеленый краситель – 50 мл или 250 мл
- Фиксатор: 50 мл или 250 мл

*Сертификат анализа и паспорт безопасности: по запросу*

## **МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР**

- Стеклянная посуда
- Предметные стекла
- Камеры Коплина
- Микроскоп (1000x увеличение)
- Масло иммерсионное
- Нагревательный столик 37 °С
- Вода дистиллированная/водопроводная

## **ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И СТАБИЛЬНОСТЬ**

Красители из набора Spermac Stain должны храниться в закрытых камерах Коплина или в оригинальных флаконах при температуре 2-25 °С. Реагенты годны к использованию в течение 36 месяцев с даты производства, если они не использовались. Тем не менее, процедуры окрашивания приводят к удалению компонентов красителей и вносят загрязнители в реагенты. Таким образом, красители следует заменить, если не достигается адекватное окрашивание. В случае, если наблюдается выпадение красителей в осадок, отфильтруйте реагенты.

## **ПОДГОТОВКА**

Налейте реагенты в камеры Коплина. Убедитесь, чтобы уровень жидкости был достаточным для покрытия окрашиваемой площади слайда (предметного стекла). Наполните камеру с фиксатором только после того, как слайды уже подготовлены, высушены и готовы для окрашивания. Наполните пятую камеру Коплина или любую иную емкость, в которой можно выдерживать предметные стекла, дистиллированной/проточной водой (для промывки слайдов между окрашиванием различными красителями). Если применяемая проточная вода является щелочной ( $\text{pH} > 7$ ), то для промывки используйте дистиллированную воду.

Очистите и промойте предметные стекла спиртом и высушите их перед использованием.

## **ОБРАЗЕЦ**

Период воздержания должен составлять 2-7 дней. Избегайте потери первой фракции спермы, поскольку она содержит пропорционально больше нормальных сперматозоидов. Не выдерживайте образец спермы более 4 ч после эякуляции перед началом теста.

## **ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ**

1. Поместите тонкий слой (со скошенной кромкой) свежей, неразбавленной, предпочтительно сжиженной спермы на стекло. Просушите на воздухе в течение 5 минут на подогреваемом столике при температуре 37 °С.

*Примечание: Не готовьте мазки и не высушивайте их вблизи открытой емкости с фиксатором, поскольку даже самые незначительные количества его паров повлияют на окрашивание. Держите емкость с фиксатором закрытой как можно дольше.*

2. Зафиксируйте мазок путем погружения слайда (препарата) по крайней мере на 5 минут в камеру Коплина, содержащую фиксатор. Более длительное фиксирование допустимо, но не обязательно.
3. Извлеките слайд из фиксатора, удалите излишки фиксатора со слайда, на короткое время поставив его вертикально на впитывающую бумагу. Не касайтесь бумагой поверхности мазка. Просушите слайд в течение 15 минут на подогреваемом столике при температуре 37 °С. В это время вынесите камеру Коплина, содержащую фиксатор, из рабочей зоны, в которой проводится тест.
4. Осторожно промойте слайд, аккуратно погружая его 7 раз в дистиллированную/водопроводную ( $\text{pH} < 7$ ) воду. Убедитесь в достаточном объеме контейнера и количестве воды в нем для полного смывания фиксатора со слайдов (если окрашивать более 5 слайдов в держателе). Если контейнер для промывки слайдов небольшой (напр., камера Коплина), повторите процедуру промывки в свежей воде. Осторожно удалите воду со слайда, на короткое время прикоснувшись торцом слайда к впитывающей бумаге.
5. Окрашивайте в течение 2 минут в Красителе А. Помещая слайд в раствор красителя, медленно погрузите его 7 раз (1 секунда – погружение, 1 секунда – извлечение) для достижения полного контакта образца с красителем. Затем оставьте слайд в растворе до завершения периода окрашивания. Поместите слайд вертикально на впитывающую бумагу. Промойте, как указано выше в п.4, погружая 7 раз в свежую проточную воду. Осторожно удалите воду со слайда, на короткое время прикоснувшись торцом слайда к впитывающей бумаге.
6. Повторите промывание в свежей воде. Такое двойное промывание после Красителя А важно! Осторожно удалите воду со слайда, на короткое время прикоснувшись кончиком к впитывающей бумаге.
7. Окрашивайте в течение 1 минуты в Красителе Б. Помещая слайд в раствор красителя, медленно погрузите его 7 раз (1 секунда – погружение, 1 секунда – извлечение) для достижения полного контакта образца с красителем. Поместите слайд вертикально на

впитывающую бумагу. Промойте, как указано выше, в свежей проточной воде. Все манипуляции производите, как описано в п.5.

8. Окрашивайте в течение 1 минуты в Красителе С. Помещая слайд в раствор красителя, медленно погрузите его 7 раз (1 секунда – погружение, 1 секунда – извлечение) для достижения полного контакта образца с красителем. Поместите слайд вертикально на впитывающую бумагу. Промойте, как указано выше, в свежей проточной воде. Все манипуляции производите, как описано в п.5.
9. Оставьте мазок на воздухе для просушивания.
10. Поместите слайд под световой микроскоп (1000x увеличение), используя иммерсионное масло, и проведите оценку окрашивания:
  - Акросома = темно-зеленая окраска
  - Ядро = красная окраска
  - Экваториальная часть = бледно-зеленая окраска
  - Средняя часть и хвост = зеленая окраска

### **ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

- Сосчитайте по крайней мере 100 (предпочтительно 200) сперматозоидов и классифицируйте их на нормальные и аномальные, указывая наиболее распространенные дефекты.
- Учитывайте только идентифицируемые сперматозоиды.
- Критерии классификации сперматозоидов на нормальные и аномальные зависят от метода классификации, используемого в лаборатории (ВОЗ 2010).
- В соответствии с руководством ВОЗ, по критериям ВОЗ 2010г. образец считается нормальным, если по крайней мере 4 % сперматозоидов имеют нормальные формы (1).

С помощью строгого применения определенных критериев морфологии сперматозоидов была установлена взаимосвязь между процентным содержанием нормальных форм и различными конечными точками фертильности (время до наступления беременности, показатели беременности *in vivo* и *in vitro*), которые могут быть полезными для прогноза фертильности (ВОЗ 2010г.).

### **ЗАЛИВКА СЛАЙДОВ**

При заливке слайдов окрашивание будет терять интенсивность под воздействием заливочной среды (через несколько недель). Таким образом, не заливайте слайды, если Вы планируете обратиться к ним через некоторое время. Осторожно удалите иммерсионное масло, которое также вызывает обесцвечивание слайдов. При необходимости работы со слайдами впоследствии предпочтительно делать дубликаты слайдов или вести фото/видео запись.

### **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ**

- Все образцы спермы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита.
- Фиксатор содержит формальдегид: токсичен при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Может вызвать раздражение слизистых оболочек. Внесен в список канцерогенов. Имеются потенциальные риски необратимого воздействия. Может вызвать повышенную чувствительность при контакте с кожей.
- Все остальные компоненты не являются токсичными.

### **ПРИМЕЧАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

- Белковоподобные или гелеобразные образцы и замороженные образцы должны быть предварительно разведены в соотношении 1:1 цитратом натрия (3%) до нанесения мазка.
- Окрашенный слайд должен быть прозрачным, и иметь лишь слегка зеленоватый оттенок. Если цвет слайда – темно-зеленый, это говорит о воздействии паров фиксатора на образец до фиксирования.
- Для транспортировки до окрашивания слайды могут быть подготовлены, зафиксированы, промыты и высушены. Во время транспортировки защищайте их от трения. При готовности проводить окрашивание, начните процесс с этапа фиксации (этап 2), т.е. образцы пройдут двойной процесс фиксации. Это является важным, поскольку фиксатор содержит буферные компоненты, обеспечивающие правильность последующего окрашивания.

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:**

FertiPro N.V., Бельгия

[www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)

**ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ:**

ООО «Селл Диагностик»

Адрес для почтовых отправлений: 220020 Минск, а/я 5

Тел.: +375 29 391 16 90

Факс: +375 17 395 88 09

E-mail: [cell.diagnost@gmail.com](mailto:cell.diagnost@gmail.com)

[www.celldiagnostic.by](http://www.celldiagnostic.by)



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ**

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.