Spermac Stain



INFORMAÇÕES GERAIS

A análise da morfologia dos espermatozoides é um dos procedimentos básicos de análise do sêmen realizados no diagnóstico e no tratamento da infertilidade masculina. Spermac Stain é um kit de coloração para diagnóstico in vitro que consiste em um fixador e três soluções corantes para espermatozoides humanos. A coloração facilita a distinção entre espermatozoides morfologicamente normais e anormais e melhora a visualização de diferentes partes da célula espermática (cabeça, acrossoma, segmento equatorial, peça intermediária e cauda).

USO PRETENDIDO

O Spermac Stain é um kit de diagnóstico qualitativo não automatizado, para uso profissional, destinado à coloração de espermatozoides humanos. A finalidade da coloração é facilitar a diferenciação entre espermatozoides morfologicamente normais e anormais. O resultado desta análise pode ajudar na avaliação do diagnóstico e do tratamento da infertilidade masculina.

MATERIAL INCLUSO

Spermac Stain — códigos do produto:

- SPS050: Corante A (vermelho) 50 mL; Corante B (verde claro) 50 mL; Corante C (verde escuro) 50 mL; Fixador 50 mL.
- SPS250: Corante A (vermelho) 250 mL; Corante B (verde claro) 250 mL; Corante C (verde escuro) 250 mL; Fixador 250 mL.

Um certificado de análise e uma FISPQ estão disponíveis mediante solicitação ao fornecedor ou podem ser baixados em www.fertipro.com.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Lâminas para microscópio.
- 5 cubas de Coplin.
- Microscópio (ampliação de 1000×).
- Óleo de imersão.
- Chapa aquecedora (37 °C).

- Água da torneira ou destilada.

MÉTODO

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Devem ser utilizados recipientes padrão para coleta de sêmen, tipicamente em polipropileno e com boa sobrevida/motilidade espermática testada, quando o sêmen é coletado por masturbação. Preservativos de plástico não tóxicos para o semen, podem ser usados quando a coleta por masturbação não for possível. Mantenha o recipiente de coleta em temperatura ambiente antes de adicionar a amostra para evitar grandes mudanças de temperatura que possam afetar os espermatozoides.

O período de abstinência deve ser de 2 a 7 dias. Evite a perda da primeira fração do sêmen, pois contém proporcionalmente mais espermatozoides normais. Não espere mais de 4 horas após a ejaculação para iniciar o teste.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

1. Coloque os Corantes A, B e C em diferentes cubas de Coplin. O nível do líquido deve ser suficiente para cobrir a área a ser corada.
2. Encha uma cuba de Coplin ou um berço com água da torneira para as etapas de lavagem (ver Nota 1).
3. Prepare as lâminas: limpe, lave com álcool e deixe secar.
4. Mantenha o frasco do reagente fixador fechado (ver Nota 2).

Nota 1: utilize água destilada se a água da torneira for alcalina (pH > 7). Se for utilizado um berço que permita a combinação de várias lâminas, ele deve ser suficientemente grande para garantir a lavagem completa.

Nota 2: o vapor do fixador interfere na coloração, mesmo em quantidades muito pequenas.

PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO

1. Misture bem o sêmen para obter uma amostra homogênea e prepare um esfregaço fino de sêmen fresco, não diluído, em uma lâmina (por exemplo, 10 µL de sêmen). Deixe o esfregaço secar por aproximadamente 5 minutos sobre uma chapa aquecedora a 37 °C.
2. Quando o esfregaço estiver seco, coloque o fixador em uma cuba. A etapa de fixação deve ser feita sob uma capela de exaustão.
3. Deixe a lâmina imersa por pelo menos 5 minutos na cuba com o fixador para fixar o esfregaço. Um tempo de fixação mais longo é aceitável, mas não é necessário.
4. Retire a lâmina da cuba com o fixador e coloque-a por um instante na vertical sobre papel absorvente para drenar o excesso de líquido. Não deixe a amostra tocar no papel.
5. Deixe a lâmina secar sobre uma chapa aquecedora a 37 °C por 15 minutos. Enquanto isso, retire a cuba de Coplin com o fixador da capela.
6. Lave com cuidado, mergulhando 7 vezes na cuba com água (ver Nota 1). Se necessário, repita a lavagem com água limpa para garantir uma lavagem completa. Drene o excesso de água tocando por um instante a extremidade da lâmina em papel absorvente.
7. Mergulhe lentamente 7 vezes no Corante A (ver Nota 3). Depois, deixe por 2 minutos na cuba, sem mexer. Coloque na vertical sobre papel absorvente. Lave com água e drene conforme especificado na etapa 3. Repita a lavagem com água. É importante lavar duas vezes depois do Corante A.
8. Mergulhe a lâmina 7 vezes no Corante B. Depois, deixe por 1 minuto na cuba, sem mexer. Coloque na vertical sobre papel absorvente. Lave com água limpa e drene conforme especificado na etapa 3.
9. Mergulhe a lâmina 7 vezes no Corante C. Depois, deixe por 1 minuto na cuba, sem mexer. Coloque na vertical sobre papel absorvente. Lave com água e drene conforme especificado na etapa 3.
10. Deixe a lâmina secar ao ar livre.
11. Observe a lâmina sob um microscópio de luz (1000×), usando óleo de imersão.

Nota 3: “lentamente” significa cerca de 1 mergulho por segundo. A imersão é importante porque garante o contato total da amostra com o corante.

INTERPRETAÇÃO

- Acrossoma = verde escuro.
- Núcleo = corado de vermelho.
- Segmento equatorial = verde claro.
- Peça intermediária e cauda = verde.

Conte pelo menos 200 espermatozoides. Classifique os espermatozoides como normais ou anormais, especificando quais são os defeitos mais comuns.

- Inclua apenas espermatozoides que possam ser identificados na contagem.

- Utilizando os critérios da OMS de 2021, uma amostra é considerada normal se pelo menos 4% dos espermatozoides apresentarem formas normais.

Pela aplicação rigorosa dos critérios de morfologia espermática, foram estabelecidas relações entre as formas percentuais normais e vários parâmetros de fertilidade (tempo para engravidar, taxas de gravidez in vivo e in vitro), que podem ser úteis para o prognóstico da fertilidade.

OBSERVAÇÕES SOBRE O USO

- Amostras proteináceas ou gelatinosas e amostras congeladas devem ser diluídas na proporção 1:1 com 3% de citrato de sódio antes do esfregaço.
- Uma lâmina corada deve ser transparente com uma tonalidade ligeiramente verde. Se a lâmina estiver verde escura, então foi exposta a vapores do fixador antes da fixação.
- Para o transporte antes da coloração, as lâminas podem ser preparadas, fixadas, lavadas e secas. Proteja contra abrasão durante o transporte. Quando estiver pronta para a coloração, inicie o processo no fixador (Etapa 2), ou seja, as lâminas recebem uma dupla fixação. Isso é importante porque o fixador contém tampões que asseguram que a coloração subsequente ocorra corretamente.

MONTAGEM DAS LÂMINAS

A coloração desbotará sob o meio de montagem (após algumas semanas). Portanto, não monte as lâminas se você quiser usá-las como referência mais tarde. Seque delicadamente o óleo de imersão, que também pode desbotar. É preferível fazer lâminas em duplicata para futura referência, se necessário, ou registros fotográficos e/ou de vídeo.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os espermatozoides corados com Spermac Stain não podem ser usados para qualquer outro procedimento.

ARMAZENAMENTO/DESCARTE E ESTABILIDADE

- O Spermac Stain deve ser armazenado em cubas de Coplin fechadas ou nos frascos originais, entre 2 °C e 25 °C.
- Adequado para transporte ou curto período de armazenamento em temperaturas elevadas (até 5 dias a 37 °C).
- Os reagentes são estáveis até a data de validade especificada no rótulo. Não use após a data de validade.
- Entretanto, a coloração remove componentes e introduz contaminantes, devendo portanto ocorrer a substituição dos corantes quando não for mais possível obter uma coloração adequada.
- Filtre os corantes caso seja observada a existência de depósito.
- Os reagentes devem ser descartados de acordo com a legislação local para descarte de dispositivos médicos.
- É difícil determinar o número de testes que podem ser realizados com um único kit Spermac Stain, já que os corantes podem ser submergidos.

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Todo material orgânico humano deve ser considerado potencialmente infeccioso. Manuseie todas as amostras como se fossem capazes de transmitir HIV ou hepatite. Use sempre roupas de proteção ao manusear as amostras (luvas, jaleco, proteção dos olhos/face).
- Fixador: contém paraformaldeído; pode causar uma reação alérgica na pele, irritação ocular grave; suspeita de causar câncer.
- Devido à toxicidade ao inalar o paraformaldeído, as etapas de utilização do fixador devem ser realizadas sob uma capela de exaustão.
- Corante A e Corante B: líquido e vapor altamente inflamáveis.
- Os corantes contêm substâncias que são identificadas como mutagênicas. Entretanto, como a concentração dessas substâncias no reagente final é baixa, os corantes em si não são identificados como mutagênicos.
- O kit não contém quaisquer substâncias desreguladoras do sistema endócrino.

REFERÊNCIAS

1. Oettlé E. An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state (abstract). Dev Growth Differentiation. 1986;28(Suppl 1):96.
2. Chan PJ, Corselli JU, Jacobson JD, Patton WC, King A. Spermac stain analysis of human sperm acrosomes. Fertil Steril. 1999;72(1):124–8.
3. Geneva: World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021, sixth edition.

IMPORTADOR BRASIL

INTERMEDICAL EQUIPAMENTOS UROLÓGICOS LTDA
Rua Paissandu 288 – Laranjeiras
Rio de Janeiro-RJ
CEP: 22210-080
01.856.395/0001-91

Se ocorrer problemas usando este produto, favor entrar em contato com nosso Atendimento ao Consumidor – (021) 2196-6100.

Registro ANVISA n.º: 80308320060 (Classe II – corantes citológicos)
Responsável técnico no Brasil: Ronaldo Reis Fontoura – CRM 5251022-5