

## Morphologietest

### Spermac Stain™

**Morphologiebeurteilung** - Unterscheidung von Akrosom, Nukleus, Äquatorialregion, Mittelstück und Schwanz.

Mit Spermac Stain™ lassen sich **pathologische Vakuolen** im Spermakopf detektieren!

50 ml-Flaschen für 200 Anwendungen  
250 ml-Flaschen für 1000 Anwendungen

**Sie benötigen: 20 µl frisches, unverdünntes Sperma**  
**Zeitaufwand: 15 Minuten + Trocknungszeit**



CE-Kennzeichen

3070	Färbelösungen A,B,C und Fixierlösung (Kit)	4 x 50 ml	36 Monate/2–8 °C
3071	Färbelösungen A,B,C und Fixierlösung (Kit)	4 x 250 ml	36 Monate/2–8 °C
3070A/B/C/F	Einzelkomponenten A, B, C oder F	1 x 50 ml	36 Monate/2–8 °C
3071A/B/C/F	Einzelkomponenten A, B, C oder F	1 x 250 ml	36 Monate/2–8 °C

## Fragen & Antworten zu Spermac Stain™:

### ***Aus welchen Färbelösungen ist Spermac Stain™ zusammengesetzt?***

Die Lösungen sind wie folgt zusammengesetzt: Färbelösung A: Rose Bengal, Neutralrot. Färbelösung B: Pyronin Y, Orange G. Färbelösung C: Janus Green, Fast Green FCF. Fixierlösung F: Formalin 4%.

### ***Welche Vergrößerung wird benötigt?***

Sie sehen die Spermien am besten bei einer 1000-fachen Gesamtvergrößerung.

### ***Kann ich nach Anfärbung mit Spermac Stain™ Vakuolen im Spermienkopf detektieren?***

In humanem Sperma können zwei Typen von Vakuolen vorliegen. Vakuolen, die auf die Anordnung der DNA im Spermakopf zurückzuführen sind, sind normal und nur elektronenmikroskopisch nachzuweisen.

Pathologische Vakuolen sind gewöhnlich in der Äquatorialregion zu finden. Hier kommen sie einzeln, aber auch vielzählig vor, dann bilden Sie eine Linie oder einen kronenartigen Ring um den Spermienkopf - hieraus leitet sich die Bezeichnung "Diademdefekt" ab.

Diese Vakuolen sind einer der Haupt-Kopfdefekte und **ausschließlich mit Spermac Stain™**, aber keiner anderen erhältlichen Färbung zu erkennen.

### ***Können die angefärbten Präparate aufbewahrt werden?***

Nein. Falls Sie Spermien-Ausstriche archivieren wollen, bereiten Sie einige ungefärbte mehr vor, die Sie in einer geschlossenen Box im Dunkeln aufbewahren.

### ***Wie unterscheiden sich die Spermienteile nach Anfärbung?***

Das Akrosom ist dunkelgrün gefärbt, der Zellkern rot. Die Äquatorialregion erscheint blassgrün, Mittelstück und Schwanz sind grün gefärbt.

# Gebrauchsanweisung Spermac Stain™

Weitere ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte der Packungsbeilage.

Artikelnummer  
3070/71

## benötigte Materialien:

- Lichtmikroskop (1000-fache Vergrößerung) + Öl
- Objektträger, Coplingefäß
- Wärmeplatte, Leitungswasser oder dest. Wasser



Scannen Sie diesen QR-Code  
und schauen Sie sich das  
Anwendungsvideo an!

## Vorbereitung:

Füllen Sie die Reagenzien in Coplingefäße. Achten Sie darauf, dass das Flüssigkeitslevel die Fläche der Objektträger bedeckt, die angefärbt werden soll. Befüllen Sie das Fixiergefäß erst, wenn die Objektträger bereits präpariert wurden, getrocknet und die Fläche zur Färbung vorbereitet wurde. Befüllen Sie ein fünftes Coplingefäß oder einen anderen Behälter, der einen Objektträger aufnehmen kann, mit Leitungswasser (zum Waschen der Objektträger zwischen den Färbegängen). Wenn das Leitungswasser zu alkalisch ist ( $\text{pH} > 7$ ), verwenden Sie destilliertes Wasser zum Waschen. Die Objektträger sollten vor dem Gebrauch gereinigt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet werden.

## Durchführung:

1. Lassen Sie einen dünnen Federstrich frisches, unverdünntes (vorzugsweise verflüssigtes) Sperma an der Luft bei 37 °C auf einer Wärmeplatte oder an der Luft trocknen.  
**Hinweis:** Keinen Ausstrich in der Nähe der geöffneten Flasche der Fixierlösung durchführen, da der Dampf der Fixierlösung (sogar in sehr geringen Mengen) mit der Färbung interferiert.
2. Die Fixierung des Ausstrichs erfolgt durch Eintauchen des Objektträgers in das Coplingefäß mit der Fixierlösung (toxisch, krebserregend, enthält Formaldehyd) für mindestens 5 min. Längere Fixierzeiten sind möglich, aber nicht nötig.
3. Entfernen Sie den Objektträger aus dem Fixierbad, stellen Sie ihn kurz auf Löschpapier, um überschüssige Fixierlösung zu entfernen. Berühren Sie die Probe nicht mit dem Papier. Lassen Sie den Objektträger auf einer Wärmeplatte für 15 min bei 37 °C trocknen.
4. Waschen Sie den Objektträger gründlich durch 7-maliges Eintauchen in Leitungswasser oder dest. Wasser. Wenn der Behälter mehr als 5 zu färbende Objektträger enthält, stellen Sie sicher, dass der Waschbehälter groß genug ist, die Fixierlösung abzuwaschen. Wenn der Waschbehälter kleiner ist (z. B. Coplingefäß) wiederholen Sie die Waschprozedur mit frischem Wasser. Entfernen Sie überschüssiges Wasser mit saugendem Papier.
5. Färben Sie die Probe 2 min in Färbelösung A. Zu Beginn der Färbung wird die Probe 7-mal in die Färbelösung langsam eingetaucht (etwa ein Dip pro Sekunde), um sicherzustellen, dass die gesamte Probe mit Färbelösung in Kontakt kommt. Lassen Sie die Probe für den Rest der Färbezeit in der Färbelösung. Waschen Sie die Probe wie oben durch 7-maliges Eintauchen in frisches Wasser. Entfernen Sie überschüssiges Wasser mit saugendem Papier.
6. Wiederholen Sie den Waschvorgang in frischem Wasser. Dieser zweite Waschschrift nach der Färbung in Lösung A ist sehr wichtig. Entfernen Sie überschüssiges Wasser mit saugendem Papier.

7. Färben Sie die Probe 1 min in Färbelösung B. Zu Beginn der Färbung tauchen Sie die Probe 7-mal langsam ein und stellen sicher, dass die Probe vollständig Kontakt mit der Färbelösung hat. Waschen Sie wie oben beschrieben mit frischem Wasser.
8. Färben Sie die Probe 1 min in Färbelösung C. Zu Beginn tauchen Sie die Probe wieder 7-mal in die Färbelösung. Waschen Sie wie oben beschrieben mit frischem Wasser.
9. Lassen Sie den Ausstrich an der Luft trocknen.
10. Werten Sie die Anfärbung unter einem Lichtmikroskop (1000x) mit Ölimmersion aus:
  - Akrosom = dunkelgrün
  - Zellkern = rot
  - Äquatorialregion = blassgrün
  - Mittelstück und Schwanz = grün

### **Ergebnisbewertung:**

- Zählen Sie mindestens 100 (besser 200) Spermien aus und stufen Sie sie als normal oder abnormal ein, vermerken Sie die häufigsten Defekte.
- Beziehen Sie nur eindeutig zu bestimmende Spermienzellen in die Auswertung ein.
- Die Kriterien zur Einstufung der Zellen als normal oder abnormal richten sich nach dem im Labor verwendeten Klassifikationssystem.
- Entsprechend den WHO-Kriterien von 2010 ist eine Probe als normal einzustufen, wenn mindestens 4% der Spermien normale Formen aufweisen.

### **Lagerung der Objektträger:**

Werden die Objektträger gelagert, verblasst die Färbung unter Lagermedium (innerhalb von Wochen). Daher lagern Sie gefärbte Objektträger nicht, wenn Sie darauf rückverweisen möchten. Entfernen Sie das Immersionsöl, das ebenfalls die Färbung verblaszen lässt. Empfehlenswert ist es daher, wenn nötig, Duplikate der Objektträger anzufertigen oder Fotos oder Videodokumentationen zu erstellen.

### **Hinweise zur Benutzung:**

- Proteinreiche oder gelatinöse Proben müssen ebenso wie gefrorene Proben vor dem Ausstrich mit 3% Natriumcitrat 1:1 verdünnt werden.
- Ein gefärbter Objektträger sollte transparent sein mit nur einem Hauch von grün. Wenn der Objektträger dunkelgrün ist, wurde der Objektträger den Dämpfen der Fixierlösung ausgesetzt vor der eigentlichen Fixierung.

### **Lagerung, Transport und Stabilität:**

Spermac Stain™ ist bei korrekter Lagerung 36 Monate ab Herstellung haltbar, wenn ungebraucht. Durch die Färbungen werden dem Produkt Bestandteile entzogen und auf der anderen Seite Verunreinigungen eingeschleppt. Die Färbelösungen sollten ersetzt werden, wenn eine adäquate Färbung nicht mehr gegeben ist. Im Fall von Ablagerungen ist eine Filterung der Lösungen möglich.

**Referenz: FP09 I21 R01 C.6, Update: 19/01/2017**