



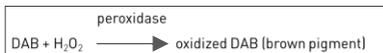
Protocole Lames leukocytes SCA

KIT POUR LA DÉTECTION DE LA PÉROXYDASE POSITIVE DANS LE SPERME (COLORATION CYTOCHÉMIQUE POUR LA DÉTECTION DES GRANULOCYTES) – À DES FINS DE RECHERCHE SEULEMENT

Principe :

Cette méthode de coloration détecte la présence de l'enzyme peroxydase dans les cellules.

Un échantillon de sperme se mélange avec un substrat spécifique pour l'enzyme peroxydase. Si la peroxydase est présente, celle-ci réduira le substrat, peroxyde d'hydrogène. En même temps, la diaminobenzidine (DAB) s'oxydera pour former un produit marron insoluble :



Avec l'emploi de cette formule, il est possible de calculer le numéro de cellules ayant peroxydase-positif dans chaque échantillon de sperme en sachant la concentration de spermatozoïdes.

Réactifs :

Solution Tampon de 7 ml, pH 7.4. Prêt à utiliser.

DAB : 1 ml de solution de diaminobenzidine. Prêt à utiliser.

Attention : La diaminobenzidine est un possible cancérigène.

Peroxyde : 1 ml de solution de peroxyde d'hydrogène. Prêt à utiliser.

Fixatif : 12 ml d'éthanol dilué. Prêt à utiliser.

Péroxydase : 0.5 ml de suspension de peroxydase. Prêt à utiliser.

Matériaux nécessaires mais pas fournis :

1. Eau distillée.
2. Pipettes et pointes.
3. Des tubes d'essai et du support pour les tubes.

Attention et précaution :

Tous les échantillons de sperme doivent être considérés potentiellement infectieux. Manipulez-les comme si eux étaient capables de transmettre le VIH ou l'hépatite. Il faut les éliminer en suivant les directrices de l'OSHA.

Stockage et Stabilité :

Stockez les réactifs à entre 2°C et 8°C. Ils peuvent être utilisés jusqu'à la date d'expiration de l'étiquette. La date d'expiration est 18 mois après la date de fabrication.

Prélèvement de l'échantillon :

Le sperme doit être recueilli dans un pot de recueil propre. L'échantillon de sperme peut être stocké à température ambiante jusqu'au moment de l'analyse.

Préparation :

1. Tenez les réactifs à température ambiante.
2. Préparez le substrat frais en ajoutant le suivant dans un tube d'essai :
 - 1 ml d'eau
 - 250 µl de Tampon
 - 40 µl DAB
 - Exactement 1 goutte de Peroxyde

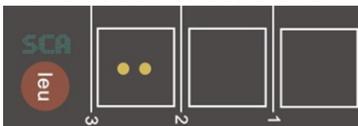
- Mélangez doucement. Jeter après usage.

Procédure de coloration :

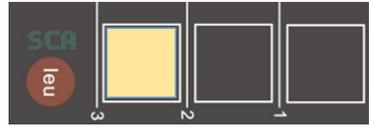
- Laissez liquéfier l'échantillon de sperme.
- Comptez les spermatozoïdes.
- À l'aide d'une pipette ajoutez 20 µl de sperme dans un tube.
- À l'aide d'une pipette ajoutez 20 µl de peroxydase, un contrôle positif, dans un deuxième tube.
- À l'aide d'une pipette ajoutez 20 µl d'eau, un contrôle négatif, dans un troisième tube.
- Ajoutez exactement une goutte de fixative dans chaque tube d'essai.
- À l'aide d'une pipette ajoutez 60 µl de substrat frais dans chaque tube et mixez brièvement.
- Observez les tubes d'essai contenant de la Peroxydase et de l'eau et repérez tout changement de couleur. Le tube contenant de la peroxydase doit devenir marron foncé. Cela indique que le substrat frais fonctionne correctement. Continuez avec l'étape suivante si le substrat frais fonctionne correctement.

Analyse :

- Ajoutez 2 gouttes équidistantes d'échantillon coloré (2µl/goutte) dans le centre d'un cadre de la lame :



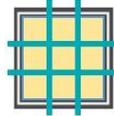
- Prenez un couvre-objet (15 x 15 mm) et placez-le soigneusement sur le cadre (la forme du couvre-objet et les lignes imprimées sur le cadre doivent coïncider). L'échantillon doit se répandre sur toute la surface du couvre-objet :



- Mettez la lame au microscope et analysez-la.

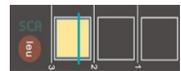
ANALYSIS avec le SCA® :

- La révision complète de l'échantillon se fait en faisant 4 transects comme ci-dessous :



Pour cela :

- Allez à un bord horizontal du couvre-objet et révissez-le en faisant un transect vertical (Seulement l'axe « Y » de la platine du microscope doit être déplacé).

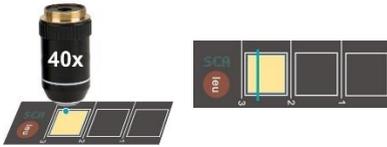


- Capturez les cellules rondes observées dans le transect. Le SCA reconnaîtra la présence d'activité de peroxydase dans les cellules (quand présente).

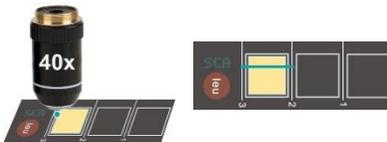
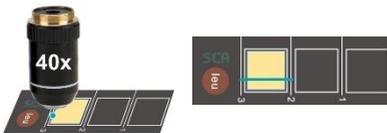
Il ne faut pas inclure dans l'analyse les cellules partiellement hors du transect. Ne déplacez jamais l'objectif hors des limites du transect pour capturer des cellules hors du transect.



- Déplacez l'objectif vers le bord opposé et analysez un deuxième transect vertical.



- Déplacez l'objectif vers le bord vertical du couvre-objet et répétez la procédure mais en décrivant deux transects horizontaux (seulement l'axe «X» de la platine doit être déplacé).



ANALYSE avec le SCA SCOPE :

- Placez la lame dans le SCA SCOPE et saisissez la référence et la position (numéro de puits) de l'échantillon à analyser. Démarrez l'analyse.

Interprétation des résultats :

- < 0.5 M Cellules/ml avec Peroxydase positive : risqué d'infection très faible..
- 0.5 - 0.9 M Cellules/ml avec Peroxydase positive : risqué d'infection.
- > 1M Cellules/ml avec Peroxydase positive : Infection

3

Références sélectionnées :

Vujisic S, Lepej SZ, *et al.* Antisperm antibodies in semen, sera and fol-licular fluids of infertile patients: relation to reproductive outcome after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:13-20.

World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.* 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.

2

Manufactured by:

Microptic S.L.

Av. Josep Tarradellas, 8, 1º 6ª – 08029 Barcelona

Phone: +34 93 419 29 10 Fax +34 93 419 94 26

www.micropticsl.com