



Protocole Lames de vitalité SCA

ÉVALUATION EN CHAMP CLAIR DE LA VITALITÉ POUR LE SPERME HUMAIN

Raisons du test : le test ci-dessus a été conçu pour mesurer deux aspects fonctionnels du sperme humain, à savoir la quantité réelle de spermatozoïdes vivants dans un échantillon et la qualité des membranes des cellules ou la capacité de la membrane de la cellule à supporter le gonflement osmotique sans éclater.

Pour mesurer la vitalité, Brightvit, une solution à base de nigrosine/éosine (NE) est utilisée. Les membranes des cellules mortes /en danger permettront à l'éosine (coloration vitale) de pénétrer la cellule en la colorant de couleur rose. Les cellules vivantes resteront blanches. La nigrosine fonctionne comme un colorant de fond pour créer un contraste.

La solution BrightVit a été conçue dans un milieu hypo-osmotique et, par conséquent, le gonflement est calculé en même temps. Les cellules/ membranes des cellules intactes se gonfleront, alors que les membranes des cellules éclatées montreront des queues droites et fines et aucun signe de gonflement. Par conséquent, ce n'est pas surprenant qu'il y ait une corrélation positive entre les cellules vivantes (blanches-sans coloration) et les spermatozoïdes gonflés.

Prérequis : Des tubes Eppendorf petits 0.5mL, Pipette (2 à 50uL) et des pointes de pipette, lames. Colle de montage comme DPX ou Eukitt et lamelles à 20 x 50 x 0.13-0.16 mm de façon optionnelle (pour la préservation des lames).

Recommandations : Assurez-vous que tous les consommables et toutes les solutions sont à la même température (37°C) afin d'éviter des chocs de température.

Le BrightVit se maintient stable pendant un an s'il est conservé dans un endroit sombre et frais <20°C.

Ce kit contient : 8mL de solution BrightVit et 200 lames de Vitalité SCA.

Procédure

Étape 1 : Ajoutez 40 µL de solution BrightVit (NE) dans un petit tube Eppendorf (30 µL pour des concentrations de spermatozoïdes très basses 1,5 millions ou moins par mL).

Étape 2 : À l'aide d'une pipette, ajoutez 10 µL de sperme dans le Eppendorf contenant la solution de BrightVit, mixez-le bien pour 15 - 20 secondes et laissez-le à 37°C pour 5-10 minutes.

Étape 3 : mettez 20 µL du mix sperme – BrightVit sur le centre d'une lame de vitalité SCA. Placez une lame normale horizontalement sur la lame contenant la goutte et laissez le mix de coloration et sperme se répandre sur la totalité de la surface des deux lames. Pour des échantillons avec une haute concentration ajoutez une goutte de 10-15 µL du mix sperme-BrightVit. Pour des échantillons avec une basse concentration (moins de 4 millions

sperme/ml) utilisez plus ou moins 20-25 μ L du mix sperme-BrightVit.

Étape 4 : Faire glisser les lames en directions opposées, vous obtiendrez deux lames à évaluer. Laissez sécher les lames à l'air à température ambiante.

Il est conseillé de monter les lames avec du Eukitt ou du DPX ou toute autre colle de montage synthétique si vous souhaitez conserver l'échantillon. Une fois montées, mettez les lames dans une boîte à l'abri de la lumière- L'éosine est sensible à la lumière et, après quelques jours ou quelques semaines, tous les spermatozoïdes pourraient devenir roses si la lame est exposée à la lumière.

Étape 5 : Analysez une des lames avec le système SCA. Analysez au moins 200, au cas où il soit impossible d'arriver à ce nombre ou il y ait quelque problème avec la première lame, utilisez la deuxième.

Les spermatozoïdes blancs sont vivants. Les spermatozoïdes roses sont morts.

Les résultats sont exprimés en pourcentage. Ce qui est important c'est que le % de vitalité (cellules blanches vivantes) doit être soit le même soit supérieur au % de sperme mobile.

Notes spéciales : l'hyperviscosité du sperme est souvent un problème chez les cliniques de fertilité. Dans ces cas, il est fortement conseillé de laver le sperme avec un milieu de lavage de sperme conventionnel ou même avec du PBS (ex: mélange 200 μ L d'échantillon frais avec 1 ml de PBS et centrifugez à 300g pour 10 minutes. Enlevez le liquide surnageant et diluez le culot avec du PBS afin d'avoir une concentration de travail d'entre 4 et 8 millions de spermatozoïdes/ml).

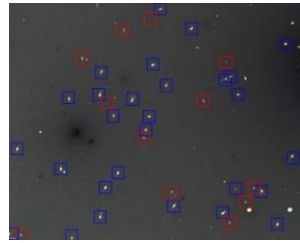


Fig. 1 : Boîtes rouges affichant les spermatozoïdes roses-morts. Boîtes bleus les spermatozoïdes vivants.

De même, l'aspiration des spécimens visqueux avec une seringue Luer-lock, en forçant l'éjection par une aiguille G18, minimise la viscosité de plasma séminal.

Interprétation des résultats

Limite de référence inférieur : Au moins 54% des spermatozoïdes doivent être vivants pour la coloration BrightVit (Spermatozoïdes blancs avec les queues gonflées).

Voir cette page pour Fig.1 montrant la vitalité analysée en mode automatique : BrightVit et Fig. 2 avec une amplification plus grande montrant toutes les cellules blanches gonflées- montrant le test de gonflement hypo-osmotique (HOS). Ces tests sont très importants pour la FIV.



Fig. 2: Les spermatozoïdes blancs présentent un gonflement osmotique des queues - normalement enrôlées car elles contiennent une gouttelette de gonflement à ce stade. En revanche, les spermatozoïdes roses ont des queues fines et droites-éclatées. Par conséquent, ici HOS=pourcentage de vitalité.

Distributed by:

Microptic S.L.

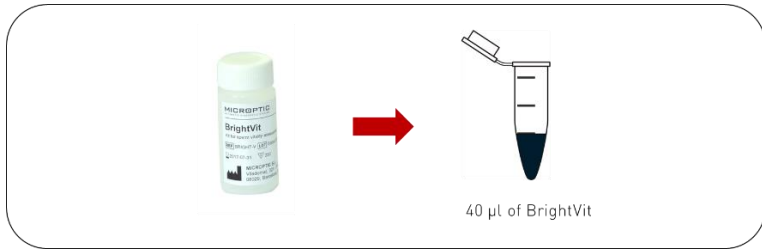
Av. Josep Tarradellas, 8, 1^o 6^a - 08029 Barcelona

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

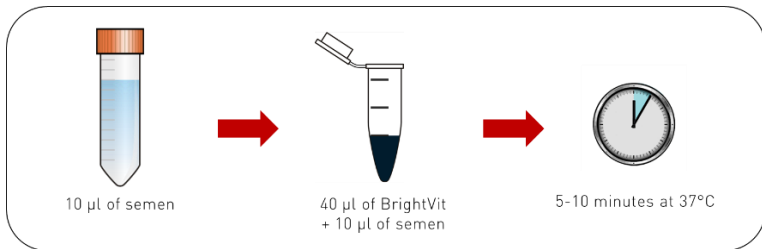
www.micropticsl.com

Rev: 2022-01-04 - v2

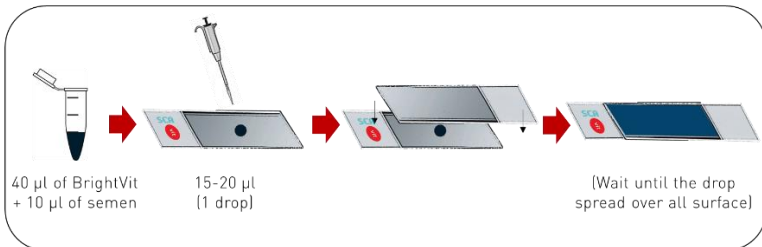
Étape 1 :



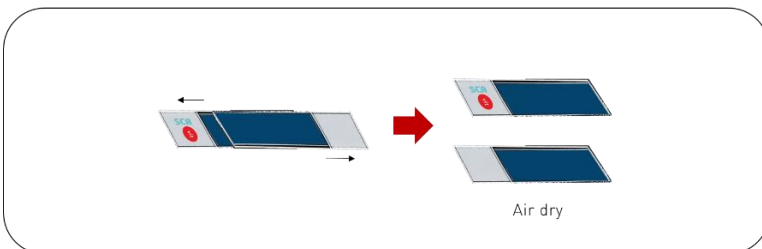
Étape 2 :



Étape 3 :



Étape 4 :



Étape 5 : Analyser avec le logiciel.