

ESPERMOTESTE

FINALIDADE:

Conjunto de reagentes para a complementação do Espermograma. Somente para diagnóstico de uso *in vitro*.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO:

Conservar entre 2 a 8°C.

Reagentes:

CVI - Corante Vital: Eosina amarela a 1%

CONT - Contraste: Nigrosina 6%

BUF - Tampão de Hipoosmolaridade: Cloreto de Sódio a 0,9%,

PIR - Piridina: Piridina 100%

AAC - Anidrido Acético: Anidrido Acético a 100%

STD - Padrão: Frutose 300 mg/dL, Ácido Cítrico 300 mg/dL, Ácido Benzóico 0,1%

RGT - Reagente de Cor: Resorcinol a 0,1%, Tiouréia a 0,1%, Etanol a 100%

RAC - Reagente Ácido: Ácido Clorídrico 55%

PREPARO DO REAGENTE DE USO:

Todos os reagentes se encontram prontos para uso.

ESTABILIDADE:

Os reagentes são estáveis até o vencimento da data de validade quando armazenados a 2º - 8°C.

TRANSPORTE:

O transporte do kit deve ser feito pela rota mais direta evitando-se as chegadas nos finais de semana e feriados no local de destino. O kit não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário no período máximo de 07 dias e em uma temperatura de até 37°C.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:

O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado como descrito acima e em sua embalagem original

PRECAUÇÕES:

- Como não se pode assegurar que amostras biológicas e não transmitem infecções, recomenda-se manuseá-los de acordo com as instruções de biossegurança.
- Todo material contaminado com amostras dos pacientes ou padrão do kit deve ser inativado por autoclavagem (60 min. a 120º) ou por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 10% por no mínimo 60 minutos;
- Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes. O PIR é tóxico e facilmente inflamável; nocivo por inalação, em contato com a pele e por ingestão. O AAC é inflamável; nocivo por inalação e ingestão; provoca queimaduras. O RGT pode ser tóxico em caso de ingestão; facilmente inflamável; pode causar irritações nos olhos e na pele em contato prolongado.
- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental.
- Os riscos residuais do kit, de acordo com critérios pré-determinados, são aceitáveis em comparação aos benefícios proporcionados pelo uso. A análise de risco foi realizada de acordo com a ISO 14971, relacionada à data final e levando em consideração a atual informação de registro.

COLETA E PREPARO DA AMOSTRA:

- O material deverá ser coletado no laboratório por automasturbação. O paciente deverá ser instruído para evitar perda de material.
- Transporte: Se a coleta não puder ser realizada no laboratório, a amostra deverá ser enviada em no máximo 30 minutos após o recolhimento. A amostra biológica deve ser acondicionada em recipiente hermeticamente fechado, em seguida embalada de forma a mantê-la em temperatura recomendada (15-25°C) desde o remetente até a entrega ao destinatário. Esta amostra deve ser identificada com o símbolo de amostra biológica.
- O período de abstinência deverá ser de 2 a 7 dias. Devem ser registrados o período de abstinência, data e hora da coleta, período de intervalo entre a coleta e o exame, medicamentos usados.
- O frasco utilizado para a coleta deve ser estéril e, se possível de plástico não espermaticida.
- Os testes serão realizados com o produto de uma única ejaculação.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

- Pipetas
- Cronômetro
- pHmetro
- Microscópio
- Câmara de Neubauer
- Tubos de ensaio
- Lâmina e lamínula
- Banho-Maria
- Fotômetro UV/VIS

PROCEDIMENTOS:

A- EXAME MACROSCÓPICO

Volume:

Em condições normais varia de 1,3 a 1,5 mL.

Consistência/Viscosidade:

Após a liquefação, a viscosidade da amostra pode ser estimada aspirando o sêmen em pipeta de vidro ou pipeta de Pauster permitindo que o sêmen caia pela gravidade, observando o comprimento do segmento do sêmen. A amostra normal deixa a pipeta em pequenas gotas discretas. Se a viscosidade é anormal, a gota irá formar um segmento de mais de 2 cm de comprimento.

Cor:

Cinza claro, tornando-se translúcido após a liquefação.

A presença de piócitos em grande quantidade confere uma cor amarelada. A presença de hemácias, hemoespermia, sugere casos de infecção específica ou hemorragias conferindo a cor vermelha.

Aspecto:

Pacientes azoospermicos tem esperma praticamente translúcido, pacientes com alta população celular tem esperma bastante opaco.

Odor:

Odor sui generis, que pode ser comparado ao da água sanitária.

Reação (pH):

O pH deve ser determinado 1 hora após a ejaculação.

Deve variar de 7,2 a 8.

pH > 8: deficiência prostática

pH < 7 em amostra azoospermica: disgenesia dos canais deferentes, vesículas seminais ou epidídimos.

Liquefação:

A liquefação normal ocorre de 5 a 30 minutos à temperatura ambiente.

A liquefação pode ser primária, parcial ou secundária.

Coagulação:

Imediatamente após a emissão o esperma transforma-se em gel. Em temperatura ambiente o gel se transforma em sol de 5 a 60 minutos após a emissão.

B- EXAME MICROSCÓPICO

Contagem:

Concentração espermática: Igual ou superior a 16 milhões/mL.

Câmara de Neubauer: a diluição depende da concentração espermática. Diluir com solução salina a 0,5% em formol

A diluição vai depender da concentração espermática que deve ser verificada entre lâmina e lamínula.

Concentração alta: diluir 1:40 a 1:50

Concentração mediana: diluir 1:20 a 1:30

Concentração muito baixa e em casos de visualização de 1 a 2 por campo: 1:2.

Cálculo: deve-se utilizar o retículo de Thoma (retículo utilizado para a contagem de hemácias), contando os 4 quadrados laterais e o central, multiplicando o número de espermatozoides obtidos x diluição x 50.000 obtendo assim os resultados em milhões por mL.

Grau de motilidade:

A verificação é feita em microscopia ótica comum entre lâmina e lamínula.

O tempo máximo para verificação do grau de motilidade é de 60 minutos,

Deve-se analisar pelo menos 10 campos com aumento de 400 vezes.

O laboratório deve classificar os espermatozoides móveis em porcentagem, dividindo-os em progressivos (espermatozoides corta o campo microscópio sem mudar de direção de forma rápida ou lenta), no progressivos (direção indefinida, errático, in situ) e imóveis.

Soma dos progressivos rápidos + progressivos lentos ≥ 30%.

Vitalidade ou Viabilidade:

A análise da viabilidade ou vitalidade espermática utiliza um corante para

determinar se os espermatozoides móveis estão vivos, mas incapazes de se mover, ou realmente mortos.

O corante Vital penetra no espermatozoide morto resultando em uma cor vermelha, enquanto o espermatozoide vivo não se cora.

Em um tubo de hemólise pipetar:

CVI	10 µL
Esperma	10 µL
Misturar bem e aguardar 1 minuto.	
CONT	20 µL
Misturar, fazer esfregaços e a microscopia por imersão contando os espermatozoides vivos e os mortos.	

$$\% \text{ Espermatozoides vivos} = \frac{\text{n}^\circ \text{ espermatozoides vivos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de espermatozoides}}$$

Pacientes normais: Acima de 54% de espermatozoides vivos:

OBS: Esta lâmina poderá ser usada para estudo de morfologia.

Morfologia:

Devem ser contados no mínimo 200 espermatozoides, sendo o resultado relatado em porcentagem.

Pode-se encontrar até 30% de espermatozoides atípicos dentre os espermatozoides analisados.

As anormalidades são classificadas em alterações de cabeça, da peça intermediária e da cauda.

De maneira alternativa pode ser usada a coloração eosina-negrosina.

C- ANÁLISES COMPLEMENTARES

Teste de Hipoosmolaridade

Este teste oferece informação adicional sobre a integridade e a funcionalidade da membrana celular da cauda do espermatozoide.

Procedimento:

- Em um tubo de ensaio colocar 0,5 mL de reagente BUF e 0,5 mL de água deionizada. Deixar em banho-maria a 37°C por 10 minutos.
- Adicionar 0,100 mL de esperma. Agitar e esperar 30 minutos em banho-maria a 37°C.

- Pipetar 20 µL do sedimento formado em uma lâmina, colocando uma lamínula por cima. Observar no microscópio, com objetiva de 400x, contar 100 espermatozoides, com e sem edema separadamente.

Espera-se número igual ou maior a 60% de espermatozoides com edema.

Determinação do Ácido Cítrico:

Este método se baseia no desenvolvimento de uma coloração amarelada originada quando o ácido cítrico reage com a piridina e anidrido acético.

Procedimento:

- Centrifugar o esperma a 3.000 rpm durante 10 minutos.

	Branco	Amostra	STD
Água deionizada	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Esperma	-	25 µL	-
STD	-	-	25 µL
Deixar em banho de gelo por 2 minutos. Deixar no banho e pipetar.			
PIR	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL
Homogeneizar.			
AAC	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Homogeneizar bem e manter por mais 2 minutos no banho de gelo. Depois deste tempo transferir os tubos para o banho-maria a 37°C e incubar por 5 minutos. Efetuar as leituras em 420 nm (filtro azul) imediatamente. Caso ocorra turvação no tubo TESTE, filtrar a solução em papel qualitativo e efetuar a leitura.			

Cálculo:

$$\text{Ácido Cítrico (mg/dL)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 300}{\text{Abs}_{\text{STD}}}$$

Valor de referência: 350 a 450 mg/dL

Linearidade: 1000 mg/dL

Determinação da Frutose:

A dosagem bioquímica mais importante no esperma é a Frutose. Se nenhum espermatozoide for observado e não se trata de controle de pós-vasectomia, um teste quantitativo para Frutose deve ser realizado.

Níveis baixos de Frutose geralmente indicam deficiência na atividade secretora das vesículas seminais, exceto em sêmens polizoospermicos (densidade espermática maior que 250 milhões/mL).

A ausência de frutose e um volume baixo de ejaculado, associado à incapacidade do sêmen de coagular-se, sugere a ausência congênita do vaso deferente e das vesículas seminais ou a obstrução dos ductos ejaculatórios.

Valores elevados são raros e de significado clínico pouco conhecido.

Este método se baseia na reação de Selivanoff, que provoca a transformação da frutose em furfural, que junto com o resorcinol produz uma coloração rosa.

Procedimento:

Após a liquefação fazer a determinação da frutose imediatamente. Não sendo possível, armazenar uma alíquota em congelador (abaixo de 0°C) para evitar a frutólise.

	Branco	Amostra	STD
Água deionizada	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Esperma	-	25 µL	-
STD	-	-	25 µL
RGT	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
RAC	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Homogeneizar bem e colocar em banho fervente por 5 minutos. Esfriar. Realizar as leituras do TESTE e do PADRÃO em 530 nm (filtro verde).			

$$\text{Frutose (mg/dL)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 300}{\text{Abs}_{\text{STD}}}$$

Valor de referência: 150 - 350 mg/dL

Linearidade: 1500 mg/dL

Determinação da Frutólise:

Fazer a determinação da Frutose. Incubar outra alíquota de esperma em estufa a 37°C por 5 horas. Após este período determinar a Frutose nesta alíquota.

Valor de referência: O valor da frutose após a incubação deve ser 50% inferior ao valor da frutose inicial.

$$\text{Frutose (mg/dL)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 300}{\text{Abs}_{\text{STD}}}$$

D- CARACTERÍSTICAS E DESEMPENHO

Repetitividade:

Foram realizadas 10 dosagens sucessivas com 2 amostras obtendo-se os seguintes resultados:

REPETIBILIDADE:

	Média (mg/dL)	DP (mg/dL)	% CV
Amostra 1			
Frutose	302,5	4,1	1,04
Ácido Cítrico	381,2	2,7	0,53
Amostra 2			
Frutose	175,7	3,1	1,4
Ácido Cítrico	420,1	2,9	0,5

REPRODUTIBILIDADE:

	Média (mg/dL)	DP (mg/dL)	% CV
Amostra 1			
Frutose	151,1	3,5	1,8
Ácido Cítrico	364,7	4,0	0,9
Amostra 2			
Frutose	280,7	4,1	1,15
Ácido Cítrico	401,8	2,8	0,6

APRESENTAÇÃO DO KIT:

Nº CAT	REAGENTE	VOLUME	Nº TESTES
022	CVI	1 x 0,5 mL	20
	CONT	1 x 1,0 mL	
	BUF	1 x 10 mL	
	PIR	1 x 15 mL	
	AAC	1 x 50 mL	
	STD	1 x 2 mL	
	RGT	1 x 10 mL	
RAC	1 x 50 mL		
022-E	CVI	1 x 1,0 mL	40
	CONT	1 x 2,0 mL	
	BUF	1 x 20 mL	
	PIR	1 x 30 mL	
	AAC	1 x 100 mL	
	STD	1 x 4 mL	
	RGT	1 x 20 mL	
RAC	1 x 100 mL		

BIBLIOGRAFIA:

- WHO: Laboratory Manual for examination and processing of human semen. Sixth Edition.
- Cançado, J. Romeu; Greco, J. B; Galizzi, João; et al.: Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica, Sexta Edição, 1985. Ed. Guanabara.
- Piva, S. "Espermograma", Livraria Editora Santos, São Paulo, 1988.
- Pereira, Orildo dos Santos; Espermograma: Manual de Bancada e Atlas. Primeira Edição, 2017.

DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS:

Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto:

Telefone: **08005919186** E-mail: invitroms@invitro.com.br

N.º DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

Produzido e Distribuído por In Vitro Diagnóstica Ltda

Rua Cromita, 278, Distrito Industrial - Itabira/MG. CEP: 35903-053

Telefone: 31-3067-6400 E-mail: invitroms@invitro.com.br

Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela - CRF 4463

Nº de Notificação M.S. 10303460313 Classe de Risco: I

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO



O conteúdo é suficiente para <n> testes



Data limite de utilização



Limite de temperatura (conservar a)



Número do Catálogo



Tóxico



Consultar Instrução de Uso



Número do lote



Produto Diagnóstico In Vitro



Inflamável



Corrosivo



Data de Fabricação