



## ESPERMOTESTE

### INSTRUÇÕES DE USO

#### MÉTODO:

Colorimétrico.

#### FINALIDADE:

Kit para a determinação da viabilidade espermática. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

#### IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES:

Conservar entre 2 e 8 °C

**R1 – Corante Vital:** Eosina amarela 1%;

**R2 – Contraste:** Nigrosina 6%;

**R3 – Tampão de Hipoosmolaridade:** Cloreto de sódio 0,9%;

**R4 – Piridina:** Piridina PA;

**R5 – Anidrido Acético:** Anidrido Acético PA;

**R6 – Padrão de Frutose:** Frutose 300mg/dL, ácido benzóico 0,1%;

**R7 – Padrão de Ácido Cítrico:** Ácido Cítrico 300mg/dL, ácido benzóico 0,1%;

**R8 – Reagente de Cor:** Resorcinol a 0,1%, tiouréia a 0,1%, etanol;

**R9 – Reagente Ácido:** Ácido Clorídrico 55%.

**Atenção:** Recomendamos o uso do reagente R4-Piridina em capela de exaustão ou em área com boa ventilação.

#### ESTABILIDADE:

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo, quando armazenados na temperatura de 2 a 8 °C. Após aberto, os reagentes R5 e R9 devem ser armazenados entre 15 e 30 °C.

#### TRANSPORTE:

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.

#### PREPARO DOS REAGENTES:

Os reagentes encontram-se prontos para uso.

#### TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:

O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado entre 2 e 8 °C e em sua embalagem original.

#### PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS:

- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação do reagente. O reagente R4 – Piridina é tóxico e facilmente inflamável. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosas;
- O R5 – Anidrido Acético é tóxico e inflamável. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosas;
- O R8 – Reagente de Cor é tóxico. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosas. Contato prolongado pode causar irritação nos olhos e pele;
- Recomendamos a aplicação das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos para a execução do teste;
- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes;
- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos

utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental;

- Não misturar reagentes de lotes diferentes;
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, evitando contaminação cruzada.

#### MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

- Potenciômetro (pHmetro);
- Pipetas;
- Cronômetro;
- Microscópio;
- Câmara de Neubauer;
- Tubos de Ensaio;
- Lâmina e Lâminula;
- Banho-maria;
- Espectrofotômetro UV/VIS.

#### AMOSTRAS BIOLÓGICAS

##### • SÊMEN

O material deve ser coletado imediatamente antes dos testes por masturbação e deve ser proveniente de uma única ejaculação. Se a coleta não puder ser realizada nas dependências do laboratório, a amostra deve ser enviada em no máximo 30 minutos após a coleta. A amostra deve ser acondicionada em recipiente hermeticamente fechado. O laboratório deverá incubar o material a 37 °C para se observar o tempo de liquefação.

O paciente deverá manter a abstinência entre 2 e 5 dias. Devem ser registrados o período de abstinência além de data e hora da coleta. Utilizar frasco estéril de plástico não espermaticida.

#### PROCEDIMENTO DO TESTE

##### 1. Observações

- O nível de água no banho-maria e de gelo deve ser superior ao dos reagentes nos tubos;
- A observação minuciosa da limpeza e secagem da vidraria, da estabilidade dos reagentes, da pipetagem, da temperatura e do tempo de reação é de extrema importância para se obter resultados precisos e exatos;
- A água utilizada nos laboratórios clínicos deve ser purificada utilizando-se métodos adequados para as finalidades de uso. Colunas deionizadoras saturadas liberam diversos íons, amins e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

##### 2. Procedimentos

###### 2.1. Exame Macroscópico:

**2.1.1. Volume:** Em condições normais, o volume do ejaculado varia entre 2 e 5 mL. Volumes maiores que 6 mL caracterizam quadros de hiperespermia. Volumes menores que 2 mL caracterizam quadros de hipoespermia. A ausência do ejaculado caracteriza a condição conhecida por aspermia.

**2.1.2. Consistência/viscosidade:** Utilizando uma pipeta de 0,1 mL com 11 cm de coluna de ejaculado, gotejar o material cronometrando. Após o gotejamento de 03 gotas, marcar o tempo. Intervalos de 4,8 a 5,2 segundos são normais. Intervalos maiores que 5,2 segundos indicam que o material apresenta viscosidade elevada. Intervalos de tempo menores que 4,8 segundos indicam que o material apresenta viscosidade reduzida.

**2.1.3. Coloração:** A amostra deve apresentar coloração cinza claro. Após liquefação, o material torna-se translúcido. A presença de piócitos confere coloração amarelada ao material. A presença de hemácias confere uma coloração avermelhada.

**2.1.4. Aspectos:** O material deve se apresentar opaco/acinzentado. Quando a concentração de espermatozoides apresenta-se reduzida, o material torna-se menos opaco.

**2.1.5. Odor:** Odor *sui generis*. Pode ser comparado ao odor do suco de castanhas.

**2.1.6. pH:** O pH deve ser determinado 60 minutos após a ejaculação e deve estar entre 7,2 e 8. Valores de pH maiores que 8 indicam quadros de deficiência

prostática. Valores de pH inferiores a 7 em amostra azospérmica, indicam disgenia dos canais deferentes, vesículas seminais ou epidídimos.

**2.1.7. Liquefação:** A liquefação normal ocorre entre 6 a 30 minutos à temperatura ambiente. Ela pode ser primária, parcial ou secundária.

**2.1.8. Coagulação:** Imediatamente após a emissão do esperma, o mesmo gelifica (transforma-se em gel). A temperatura ambiente, o ejaculado transforma-se em solução entre 15 a 30 minutos após a emissão.

##### 2.2. Exame Microscópico:

**2.2.1. Contagem:** A concentração espermática deve ser superior a 20 milhões de espermatozoides/mL de ejaculado. A diluição para aplicação na câmara de Neubauer é dependente da concentração de espermatozoides da amostra. Deve-se diluir o material com solução salina 0,5% em Formol.

Diluições de 1:50 a 1:100 são elevadas. De 1:20 a 1:30 são baixas e de 1:5 a 1:10 são muito baixas.

O cálculo deve ser realizado considerando para espermatozoides/mL: (número contado x diluição x 10.000)/4, sendo 4 o número de quadrantes da câmara para contagem de leucócitos. Contagens acima de 20 milhões de espermatozoides/mL são normais (normozoospermia). Entre 1 a 20 milhões de espermatozoides/mL ocorrem em quadros de oligoespermia. Quadros de ausência de espermatozoides ocorrem em quadros de azoospermia. Quadros acima de 250 milhões de espermatozoides/mL caracterizam polizoospermia.

**2.2.2. Grau de Motilidade:** A motilidade deve ser classificada em:

Grau A: Motilidade rápida, progressiva e linear;

Grau B: Motilidade lenta e/ou não linear;

Grau C: Motilidade não progressiva;

Grau D: Sem motilidade.

Pacientes normais apresentam no mínimo 25% dos espermatozoides com grau A.

**2.2.3. Aglutinação:** Deve ser verificada a aderência dos espermatozoides móveis uns aos outros. A aderência pode ser cauda-cauda, cabeça-cabeça, peça intermediária-peça intermediária ou mista. Até 5% dos espermatozoides com aderência estão presentes em pacientes normais.

**2.2.4. Vitalidade:** A vitalidade reflete a proporção de espermatozoides vivos e mortos. O corante vital penetra nos espermatozoides mortos, o que resulta em coloração avermelhada. Os espermatozoides vivos não se coram.

Pipetar em um tubo	Amostra
R1 – Corane Vital	10 µL
Esperma	10 µL
<b>Agitar vigorosamente e aguardar 1 minuto</b>	
R2 - Contraste	20 µL
Agitar vigorosamente e fazer esfregaços espessos. A microscopia deve ser por imersão realizando-se a contagem dos espermatozoides vivos e os mortos.	

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

Paciente normais: Acima de 58% de espermatozoides vivos.

Obs.: A lâmina pode ser utilizada para estudos de morfologia.

**2.2.5. Morfologia:** Devem ser contados 200 espermatozoides. O resultado deve ser relatado em porcentagem. Até 30% de espermatozoides atípicos podem ser encontrados caracterizando um quadro normal. As anormalidades incluem alterações de cabeça, peça intermediária e cauda. Recomenda-se o uso da lâmina da análise de vitalidade para o teste, mas também pode-se utilizar coloração pelo método de May-Grünwald-Giemsa ou Papanicolau além do Vital.

##### 2.3. Análises complementares

**2.3.1. Teste de Hipoosmolaridade:** Fornece informação sobre a integridade e funcionalidade da membrana celular da cauda do espermatozoide.

Pipetar em um tubo	
R3 – Tampão de Hipoosmolaridade	0,5 mL
Água deionizada	0,5 mL
Deixar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos	
Amostra	0,1 mL
Agitar vigorosamente e aguardar 30 minutos em banho-maria a 37 °C. Pipetar 20 µL do sedimento formado em uma lâmina. Adicionar lâmina sobre o material. Deve ser contabilizada a porcentagem de espermatozoides com edema em relação ao número total.	

Valores de referência: Deve ser igual ou superior a 60%.

**2.3.2. Determinação do Ácido Cítrico:** O ácido cítrico na amostra reage com a piridina e com o anidrido acético resultando em produto com coloração amarelada.

Centrifugar o material a 3000 rpm por 10 minutos e utilizar o sobrenadante. Identificar 3 tubos como branco, amostra e padrão. Apenas um branco e padrão são necessários por bateria de testes.

Pipetar em um tubo	Branco	Amostra	Padrão
Água deionizada	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Amostra	-	25 µL	-
R7 – Padrão de Ac. Cítrico	-	-	25 µL
Deixar em banho de gelo por 2 minutos. Com os tubos no banho de gelo, pipetar:			
R4 - Piridina	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL
Homogeneizar.			
R5 – Anidrido Acético	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Homogeneizar vigorosamente e manter por mais 2 minutos no banho de gelo. Transferir os tubos para o banho-maria a 37 °C. Incubar por 5 minutos. Realizar as leituras em 420nm ou filtro azul. Pode ocorrer turvação no tubo teste. Nesse caso, filtrar a solução em papel quantitativo e realizar a leitura.			

$$\text{Ácido cítrico (mg/dl)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 300}{\text{Abs}_{\text{padrão}}}$$

Valor de referência: 350 a 450 mg/dL.

Linearidade: 1000 mg/dL.

### 2.3.3. Determinação da Frutose:

A reação baseia-se na transformação da frutose em furfural, que em presença de resorcinol, produz uma coloração rósea.

Após a liquefação do material, realizar a determinação da frutose imediatamente. Se não for possível, uma alíquota pode ser armazenada congelada para evitar a frutólise.

Pipetar em um tubo	Branco	Amostra	Padrão
Água deionizada	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Amostra	-	25 µL	-
R6 – Padrão de Frutose	-	-	25 µL
R8 – Reagente de Cor	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
R9 – Reagente Ácido	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Homogeneizar vigorosamente, colocar em ebulição por 5 minutos. Deixar o material esfriar e realizar a leitura do teste e padrão em 530 nm ou filtro verde.			

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

Valor de referência: 150 a 300 mg/dL;

Linearidade: 1500 mg/dL.

### 2.3.4. Determinação da Frutólise:

Após a determinação da frutose, incubar uma segunda alíquota de esperma em

estufa a 37 °C por 5 horas. Após esse período determinar a frutose nessa alíquota.

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

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### 1. Repetibilidade e reprodutibilidade

Foram utilizadas amostras de pacientes normais para a determinação da repetibilidade e reprodutibilidade do kit. Trinta determinações foram realizadas com o kit de Espermoteste da VIDA Biotecnologia para a determinação da repetibilidade e 10 determinações para a reprodutibilidade. As médias das determinações foram calculadas e comparadas com os valores alvo.

#### 5.1 Repetibilidade

Amostra	N	Média dos valores obtidos	DP	CV (%)
Amostra 1 Frutose Ácido Cítrico	30	303,4 392,7	4,3 2,9	1,42 0,74
Amostra 2 Frutose Ácido Cítrico	30	184,9 427,2	2,9 3,2	1,56 0,75

#### 5.2 Reprodutibilidade

Amostra	N	Média dos valores obtidos	DP	CV (%)
Amostra 1 Frutose Ácido Cítrico	30	307,8 396,3	4,9 3,4	1,60 0,86
Amostra 2 Frutose Ácido Cítrico	30	188,3 433,8	2,9 3,9	1,54 0,90

### RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

As medidas de redução dos riscos foram implementadas e o produto não apresenta riscos maiores que os benefícios obtidos com o seu uso; e se usado por profissionais qualificados e treinados, cientes das precauções descritas nos produtos, desempenhará suas funções com qualidade, segurança e eficácia.

### APRESENTAÇÃO DO KIT

CÓDIGO	REAGENTE	VOLUME	NÚMERO DE DETERMINAÇÕES
100/320-020	R1 - CORANTE VITAL	1 X 0,5 mL	20
	R2 - CONTRASTE	1 X 1,0 mL	
	R3 – TAMPÃO DE HIPOOSMOLARIDADE	1 X 10 mL	
	R4 – PIRIDINA	1 X 15 mL	
	R5 – ANIDRIDO ACÉTICO	1 X 50 mL	
	R6 – PADRÃO DE FRUTOSE	1 X 1 mL	
	R7 – PADRÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	1 X 1 mL	
	R8 – REAGENTE DE COR	1 X 10 mL	
	R9 – REAGENTE ÁCIDO	1 X 50 mL	

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 – WHO: Manual of basic techniques for a healthy laboratory;  
2 – Cançado, J. Romeu; Greco J. B.; Galizzi, João; e al.: Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica, sexta edição. 1985. Ed. Guanabara.

3 – Piva, S. “Espermograma”, Livraria Ediora Santos, São Paulo, 1988.

4 – Janini J. B. M., Pereira, O. S.. Atlas de Morfologia Espermática. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2001.

5- Laboratory manual for the examination and processing of human sêmen – World Health Organization - 5ª Ed

### INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR:

A VIDA Biotecnologia garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nessa instrução sejam seguidos corretamente.

Nº DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E DATA DE VALIDADE, VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

### PRODUZIDO E DISTRIBUÍDO POR: VIDA Biotecnologia LTDA

CNPJ: 11.308.834/0001-85

Avenida José Cândido da Silveira 2100 – Horto Florestal – CEP 31035-536; Belo Horizonte. Minas Gerais – www.vidabiotecnologia.com.br

Departamento de Serviços Associados | (31)34663351; dsa@vidabiotecnologia.com.br

Responsável Técnico: Renato Silva CRBIO4 – 57360/04-D

Reg. M.S.: 80785070045

Rev.: 01/2022

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NO RÓTULO DO PRODUTO	
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data limite de utilização do produto (dd/mm/aaaa)
	Material Calibrador
	Limite de temperatura (conservar a)
	Consultar instruções de uso
	Número de catálogo
	Produto para Diagnóstico In Vitro
	Liofilizado
	Corrosivo
	Risco Biológico
	Tóxico
	Reagente
	Data de Fabricação (mm/aaaa)
	Número de Lote