

CANfrag**Kit para avaliar a fragmentação do DNA espermático****"USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO"****Nome Técnico:** Classe II - DISPERSÃO DE CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD)**Ref:** CA-001**Introdução:**

- CANfrag é o kit projetado para detectar a fragmentação do DNA no espermatozóide humano; os espermatozóides com DNA não fragmentado mostram os halos dispersos de DNA, enquanto os espermatozóides com DNA fragmentado mostram mínimos ou nenhum halo.
- O CANfrag é um dispositivo diagnóstico in vitro (IVD) reservado somente para uso profissional para ser usado em instituições de cuidado com a saúde ex: laboratórios médicos, laboratórios especializados em técnicas de fertilização, incluindo IVF, ICSI e preparação/análise de espermatozóide. O uso se destina a profissionais IVF (técnicos de laboratório, embriologistas ou médicos).

Princípio de funcionamento:

- O princípio do kit é baseado na interpretação da diferença entre DNA fragmentado e intacto nos espermatozóides. Os espermatozóides embebidos na matriz de agarose são sobrepostos na lâmina revestida e expostos à solução ácida seguida pela solução de lise. Após a exposição, os espermatozóides com DNA não fragmentado mostram os halos dispersos de DNA, enquanto os espermatozóides com DNA fragmentado mostram mínimos ou nenhum halo. Sêmen fresco, bruto, diluído, congelado/descongelado e processado pode ser analisado por este kit. Além disso, o teste é fácil de interpretar, rápido, confiável, reproduzível e equivalente ao SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay).

Materiais fornecidos:

- O produto consiste na seguinte apresentação:

CÓDIGO	NOME - COMPONENTE DO PRODUTO
CA-001	CANfrag

COMPONENTES	CA-001/03	CA-001/05	CA-001/010
	3 Testes	5 Testes	10 Testes
Lâminas revestidas	3 un	5 un	10 un
Tubos de gel de agarose	3 un	5 un	10 un
Tubos de diluição	6 un	10 un	20 un
Desnaturante ácido	4ml	6ml	11ml
Solução de Lise	4ml	6ml	11ml

INSTRUÇÕES DE USO

Solução corante	4ml	4ml	8ml
Tampão de diluição do corante	4ml	4ml	8ml
Lamínulas (25 mm x 50 mm)	1 caixa	1 caixa	1 caixa
Flutuador	1 un	1 un	1 un

Reagentes e equipamentos necessários, mas não fornecidos:

- PBS (solução salina tamponada com fosfato)
- Meios de preparação de esperma
- Água destilada
- 70%, 90%, 100% de etanol
- Luvas e máscara descartáveis
- Coplin Jar
- Lápis
- Seringa / conta-gotas
- Micropipetas
- Pontas de Micropipetas
- Banho d'água
- Banho seco / Aquecedor de tubos / Incubadora
- Geladeira
- Microscópio de campo brilhante

Armazenamento e estabilidade:

- O kit deve ser armazenado à temperatura de 5 a 25°C.
- Os frascos de reagente devem ser bem fechados imediatamente após o uso.
- Os reagentes do kit após o prazo de validade indicado no rótulo não devem ser utilizados para o processamento da amostra.

Procedimento:

- Sêmen fresco, bruto, diluído, congelado/descongelado e processado pode ser analisado por este kit
- Realize a análise o mais rápido possível após a liquefação da amostra fresca ou da amostra criopreservada descongelada.

A. Preparação da amostra:

- Colete a amostra no frasco de coleta de sêmen estéril. Permita que a amostra se liquefaça a 37°C, evite a liquefação manual, se possível, e faça a contagem de espermatozóides. Se necessário, dilua a amostra com PBS / meio de preparação de espermatozóides até a concentração em torno de 15 a 20 milhões / ml.

NOTA: As diluições da amostra devem ser realizadas nos TUBOS DE DILUIÇÃO fornecidos no kit. A diluição da amostra de sêmen não deve ser feita com o uso de água. Tampão e formalina são preferidos para diluição.

B. Processamento de slides:

NOTA: Todas as etapas devem ser executadas na superfície plana. Sempre use pontas separadas de micropipetas para diferentes reagentes.

1. Coloque o tubo de Agarose Gel no flutuador e incube em água fervente a 90°C-100°C por 2 minutos ou até o gel derreter. Em seguida, esfrie este tubo a 37°C por 5 minutos.

2. Adicione 40 µl de amostra de sêmen do tubo de preparação de amostras ao tubo de Agarose Gel derretido e misture delicadamente para evitar a formação de bolhas.

3. Coloque 150 µl de suspensão na lâmina revestida, cubra com a lamínula fornecida, evitando bolhas de ar e transfira a lâmina de 4°C para 8°C por 5 minutos para solidificar o gel.

4. Retire a lamínula e remova-a com cuidado, deslizando-o para fora.

NOTA: Deve-se tomar precaução durante a remoção da lamínula da lâmina, para que a integridade do gel não seja afetada.

5. Coloque a lâmina em uma superfície uniforme e sobreponha 1ml de desnaturante ácido. Incubar a 22°C por 7 minutos e drenar a solução completamente após a incubação.

NOTA: Sobreponha a solução de forma a cobrir todo o gel.

6. Sobrepor 1ml de solução de lise e incubar por 10 minutos em temperatura ambiente. Escorra a solução completamente após a incubação.

7. Lave cuidadosamente a lâmina com 20ml de água destilada com a ajuda de uma seringa ou conta-gotas, colocando a lâmina na posição inclinada verticalmente.

8. Coloque a lâmina em uma superfície uniforme e desidrate sequencialmente a lâmina, cobrindo 1ml de 70%, 90%, 100% de etanol e incubar por 2 minutos cada. Em seguida, drene completamente o excesso de solução.

9. Deixe secar completamente a lâmina. A lâmina processada pode ser armazenada no escuro em temperatura ambiente por meses.

10. Cole a lâmina como segue antes de pontuar.

C. Coloração:

Preparação do corante::

Pegue 300µl de solução corante e adicione 300µl de tampão de diluição no tubo de diluição fornecido no kit e misture adequadamente. Esse corante diluído deve ser usado dentro de 1 hora.

Procedimento:

1. Coloque a lâmina processada horizontalmente.

2. Sobreponha 500µl da solução de corante preparada na hora na lâmina e espalhe uniformemente o corante, girando cuidadosamente a lâmina.

3. Mantenha a lâmina na superfície horizontal por 8 a 10 minutos para obter a coloração do espermatozoide e da auréola.
4. Após 8 a 10 minutos, lave a lâmina mergulhando e movendo-a em um frasco de acoplamento ou em um copo cheio de água da torneira.
5. Coloque a lâmina na posição inclinada e deixe secar ao ar.
6. Observe a lâmina abaixo de 20X e 40X do microscópio de campo claro.

D. Resultados e Interpretação:

As células que correspondem aos espermatozoides, juntamente com a presença da cauda, são levadas em consideração apenas para a pontuação.

De preferência, marque 200 espermatozoides.

Pontuação:

A	B
Espermatozoides sem fragmentação do DNA: Dispersão de halo maior ou igual a 1/3 da largura da cabeça.	Espermatozoides com fragmentação de DNA: Dispersão de Halo com largura inferior a 1/3 da cabeça ou sem Halo.
	

E. Cálculo SDF

Células sem cauda e cuja morfologia não corresponde aos espermatozoides são consideradas outros tipos de células.

O cálculo do valor da fragmentação do DNA do espermatozoide (SDF) é feito da seguinte maneira:

$$\text{Valor do SDF (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides fragmentados}}{\text{Número total de espermatozoides marcados}} \times 100$$

Valor de referência do SDF = 25% *

* Os valores obtidos após o cálculo do SDF devem corresponder a todos os achados clínicos e laboratoriais anteriores da respectiva amostra de sêmen. O teste oferece informações quantitativas presumíveis sobre a fragmentação do DNA de espermatozoides.

- Lâmina de controle positivo: omita a etapa 5 do processamento da lâmina e siga a etapa restante do procedimento.
- Lâmina de controle negativo: Após a etapa 4 do processamento da lâmina, sobreponha 100µl de 300µM H₂O₂* e incube por 5 minutos a 4°C. Descarte a solução e o processo com a etapa 5 em diante, conforme as instruções

* Não fornecido com o kit.

Características de desempenho:

De acordo com o princípio do ensaio de dispersão da cromatina do esperma (SCD), a interpretação do teste baseia-se na formação de halo em torno da cabeça do esperma.

O tamanho do halo determina a integridade do DNA. Maior tamanho do halo não indicava fragmentação do DNA, enquanto pequeno ou nenhum halo indicava fragmentação do DNA no esperma.

Os espermatozoides são incorporados na matriz de gel e, quando expostos aos diferentes reagentes seqüenciais, formam o halo e, quando corados, são observados ao microscópio de campo claro. O valor da fragmentação do DNA espermático (SDF) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Valor do SDF (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides fragmentados}}{\text{Número total de espermatozoides marcados}} \times 100$$

O limiar para o valor de SDF foi mantido $\leq 25\%$, onde as amostras que apresentaram SDF menor que 25% foram consideradas normais e amostras com SDF acima de 25% indicaram fragmentação do DNA. A severidade da fragmentação do DNA aumentou com o aumento da porcentagem de DFI.

De acordo com os resultados, a estabilidade e a reprodutibilidade do teste pelo kit CANfrag é muito superior ao mínimo solicitado. O valor da fragmentação do DNA espermático obtido correspondeu ao achado clínico e laboratorial anterior da respectiva amostra de sêmen.

O problema prático encontrado durante o problema de validação ocorreu devido à adição na amostra de sêmen no gel quente.

A conclusão geral é que o kit CANfrag atende aos requisitos para a detecção precisa da fragmentação do DNA nos espermatozoides humanos.

Precauções:

- Todas as amostras e reagentes devem ser tratados como potencialmente perigosos.
- As soluções e reagentes devem ser descartados em um recipiente adequado de risco biológico ao final do processo.

Bibliografia:

- 1- Threshold for frequency of sperm DNA Fragmentation (SDF) have been suggested by Evenson et al. (Evenson and Wixon , Reprod Biomed Online 12:466-472. 2006)
- 2- R. K. Sharma, T. Said, A. Agarwal (2004), Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome, Asian J Androl , Jun; 6:139-148
- 3- Marziyeh Tavalaei, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, Mohammad Reza Deemeh, (2008) International Journal of Fertility and Sterility, Vol 2, No 1, Pages: 1-8
- 4- <https://www.scsadiagnostics.com/uploads/content/clinicalreport.pdf>

Versão: 01 - 24/05/2022.

IMPORTADOR:

INTERMEDICAL SERVICE IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE EQUIPAMENTOS MÉDICOS LTDA

Rua da Conceição, 125 - Sala 1011, Centro - Niterói/RJ

CNPJ: 11.205.033/0001-94

SAC: (21) 2196-6117

Site: www.intermedicalrio.com.br

Responsável Técnica: Paula Fontoura Coelho de Souza - CRBIO-RJ 71021/02

Notificação ANVISA nº: 81931150002

FABRICANTE LEGAL:

CANDORE BIOSCIENCE

5, Prime Industrial Park-2, Santej Vadsar Road, Santej : 382721, Kalol, Gandhinagar, Gujarat, Índia