LensHooke R10 Plus



Indicação de uso

O LensHooke® R10 (Sperm DNA Fragmentation Test Kit – SCD Assay) é um ensaio in vitro destinado à avaliação da fragmentação do DNA em amostras de sêmen humano. O método SCD (Sperm Chromatin Dispersion) permite estimar a proporção de espermatozoides com DNA fragmentado, expressa como índice de fragmentação do DNA (DFI). O produto é destinado ao uso profissional.

Por que avaliar a fragmentação do DNA espermático?

A análise seminal convencional avalia concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides, mas não determina diretamente a integridade do material genético. A fragmentação do DNA espermático pode estar associada a alterações na fertilidade, no desenvolvimento embrionário e em desfechos reprodutivos. Por isso, a avaliação do DFI pode fornecer informação complementar à análise seminal, sem substituí-la.

Princípio do método

O ensaio utiliza o método Sperm Chromatin Dispersion (SCD). A amostra de sêmen é incorporada a uma matriz de agarose e aplicada sobre uma lâmina pré-tratada. Após a etapa de desnaturação do DNA, ocorre a lise das proteínas nucleares e a coloração do material.

A resposta de dispersão da cromatina permite diferenciar as células conforme o padrão de halo observado ao microscópio:

- Espermatozoides não fragmentados: apresentam halo de dispersão da cromatina ao redor da cabeça.
- Espermatozoides fragmentados: não apresentam o halo característico.

O método SCD avalia a fragmentação global do DNA e não diferencia, individualmente, quebras de fita simples e de fita dupla.

Componentes do kit

Componente	Quantidade / apresentação indicada no folheto
Reagente desnaturante de DNA (DNA Denaturant Reagent)	1 frasco de 15 mL
Solução de lise (Lysis Solution)	1 frasco de 15 mL
Agarose em tubo (Float / Agarose Gel)	10 tubos de 60 µL
Lâminas pré-tratadas	2 caixas com 5 lâminas cada
Lamínulas pré-coradas (Prestained Cover Slip)	1 caixa com 20 unidades
Microtubos com agarose (para preparação)	10 unidades de 0,5 mL
Microtubos para preparação do sêmen	10 unidades de 1,5 mL

Preparação da amostra

Utilize amostras com concentração final de 5–10 milhões de espermatozoides/mL. A amostra deve ser diluída, caso necessário, antes da incorporação à agarose.

Protocolo de execução

1. Preparação da amostra e incorporação à agarose

- Colocar o tubo de agarose em água quente a 95–100 °C por aproximadamente 1,5 minuto, até a fusão do material.
- Adicionar 30 µL da amostra de sêmen diluída ao tubo contendo a agarose fundida e homogeneizar.
- Retirar 30 µL da mistura e aplicar separadamente nos poços 1 e 2 da lâmina de teste.
- Colocar a lamínula sobre as áreas de teste e levar a lâmina à geladeira, entre 2 °C e 8 °C, por 5 minutos.
- Retirar a lâmina da geladeira e deslizar cuidadosamente a lamínula para removê-la.

2. Desnaturação

- Adicionar 10 gotas do reagente desnaturante de DNA em cada poço.
- Aguardar 3 minutos. Em seguida, drenar o líquido e absorver cuidadosamente o excesso.

3. Lise

- Adicionar 10 gotas da solução de lise em cada poço.
- Aguardar 3 minutos. Drenar o líquido e absorver o excesso.
- Adicionar aproximadamente 1 mL de água destilada sobre toda a área de teste e aguardar 3 minutos. Drenar e absorver o excesso.
- Adicionar 50 µL de etanol a 75% em cada poço e prosseguir imediatamente para a etapa de coloração.

4. Coloração e lavagem

- Cobrir separadamente cada área de teste com uma lamínula pré-corada (Prestained Cover Slip) e aguardar 1 minuto.
- Deslizar cuidadosamente a lamínula para removê-la.
- Enxaguar suavemente a lâmina com água destilada até remover o excesso de corante.
- Deixar a lâmina secar ao ar, à temperatura ambiente, entre 15 °C e 30 °C.

Avaliação microscópica e cálculo do DFI

Após a coloração e secagem, avaliar os espermatozoides ao microscópio e classificá-los conforme a presença ou ausência do halo de dispersão.

Classificação	Padrão observado
Não fragmentado	Presença de halo de dispersão da cromatina.
Fragmentado	Ausência do halo característico.

O índice de fragmentação do DNA (DFI) corresponde à porcentagem de espermatozoides classificados como fragmentados entre todos os espermatozoides avaliados.

DFI (%) = (Nº de espermatozoides sem halo ÷ Nº total de espermatozoides avaliados) × 100

Interpretação dos resultados

O resultado deve ser apresentado como percentual de espermatozoides com ausência do halo característico.

A interpretação deve considerar a indicação do exame, o intervalo de abstinência, a variabilidade pré-analítica, os parâmetros seminais e o contexto clínico do casal. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça e valide seus próprios critérios de decisão.

Limitações

- O ensaio avalia a fragmentação global do DNA espermático e não permite distinguir diretamente quebras de fita simples de quebras de fita dupla.
- A classificação microscópica depende da qualidade da preparação, da coloração, da leitura e do treinamento do profissional.
- O resultado não deve ser interpretado isoladamente nem utilizado como preditor absoluto de gravidez, implantação, aborto ou nascimento vivo.
- O produto é destinado à análise de amostras de sêmen humano e ao uso por profissionais qualificados.

Segurança e cuidados

- Utilizar equipamentos de proteção individual adequados durante todo o procedimento.
- Tratar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas.
- Manusear reagentes conforme as respectivas fichas de segurança e instruções do fabricante.
- Descartar amostras, reagentes e materiais utilizados conforme as normas de biossegurança e os regulamentos locais.

Registro ANVISA: 25351033798202664