

LeucoScreen

IVD

Documento ID: FP09 I05 R01 B.13, Atualização: 5/09/2018
Kit semi-quantitativo histoquímico para a determinação de células brancas sanguíneas peróxido-positivas no sêmen humano.
Para uso de diagnóstico in vitro – Reagente somente para uso profissional

INTRODUÇÃO

A maioria dos homens ejacula contendo células brancas sanguíneas (GB), sendo sua maioria granulócitos peroxidase-positivos^{1,2,3,4}. A presença dessas células em excesso (leucospermia) pode indicar a existência de infecção no trato reprodutor. Além disso, leucospermia pode estar associada com defeitos nos parâmetros seminais. Incluindo reduções do volume ejaculado, da concentração de espermatozoide e da motilidade dos espermatozoides, assim como perda de função dos mesmos como resultado do estresse oxidativo^{2,5} e/ou secreção de citocinas citotóxicas⁶. Embora a leucospermia não seja um indicativo absoluto de infertilidade, essa condição é observada em 10 a 20% de todos os homens inférteis⁸.

Quando uma típica análise do esperma é feita, é muito difícil diferenciar leucócitos de outras células redondas na amostra de Sêmen (por exemplo células precursoras da espermatogênese⁷). Uma relativamente rápida e barato método de diferenciar leucócitos peroxidase positivas de outras células redondas em uma amostra de Sêmen faz-se o uso de atividade peroxidase intrínseca dessas células. LeucoScreen é baseado nessa técnica e pode conseqüentemente ser usado para corar os leucócitos peroxidase positivos numa amostra de Sêmen humano.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a presença de mais do que um milhão de leucócitos peroxidase positivos por ml de ejaculado é considerado anormal e diagnosticado como "leucocitospermia"⁴. Entretanto, esse limite está sob debate, alguns acham muito baixo e outros muito alto. De fato, níveis que variam de $0.2 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ tem sido relatados⁹⁻¹⁰.

Quando o limite de um milhão de leucócitos peroxidase positivos por ml de ejaculado é excedido, testes microbiológicos devem ser feitos para ver se existe uma infecção glandular acessória. Acesso aos marcadores glandulares acessórios podem fornecer informação adicional a respeito da função do Epidídimo (Episcreen Plus, FertiPro N.V.), Vesículas Seminais (Fructose Test FertiPro N.V.), ou Próstata (Citric Acid Test, FertiPro N.V.). Importante, a ausência de leucócitos não exclui a possibilidade de infecção da glândula acessória.

O número de testes que podem ser realizados com o kit LeucoScreen não é especificado, ao invés disso, o kit foi projetado para 20 dias de análise.

MATERIAL INCLUSO NO TESTE

- Reagente 1 - 20ml de corante LeucoScreen (Contém: benzidina, cianosina e metanol)
 - Reagente 2 - 1ml de peróxido de hidrogênio a 3%
- Um certificado de análise e o MSDS (Ficha de Segurança do Material) estão disponíveis no nosso website (www.fertipro.com).

MATERIAL NÃO INCLUSO NO TESTE

Lentes objetivas, óculos de proteção, pipetas, microscópio.

PRINCÍPIO DO TESTE

Grânulos em células brancas polimorfonucleares contém peroxidase. A peroxidase catalisa o peróxido de hidrogênio em água e íons livres de oxigênio, que, por sua vez, oxidam benzidina. A benzidina oxidada se torna marrom e, conseqüentemente, células peroxidase positivas têm coloração marrom. O reagente 1 também contém fluido de contraste vermelho visando diferenciar células redondas peroxidase positivas das redondas peroxidase negativas.

INTERPRETAÇÃO

- **Células redondas peroxidase positivas** são coradas variando de amarelo para marrom-avermelhado. Esses são leucócitos polimorfonucleares.

Nota: células positivas são completamente ou parcialmente coradas, algumas vezes apenas visível como spots marrons.

- **Células redondas Peroxidase negativas** coram de rosa. Essas são outra células redondas (p. ex. espermátides, leucócitos peroxidase negativos).

TIPO DE AMOSTRA

Sêmen liquefeito nativo contendo mais de 1×10^6 células redondas por ml.

MÉTODO¹¹

1. Conte o número de células redondas enquanto determina a concentração espermática durante a rotina de análise do Sêmen. Calcule e escreva a concentração total de células redondas em mil/ml, como isso será necessário para o cálculo da concentração de leucócitos peroxidase positivos. Quando a concentração de células redondas no ejaculado excede 1×10^6 por ml, performar o teste.
2. Preparação da solução de trabalho **um sob capela de exaustão** (Reagente 1 é venenoso): Adicionar 30µl de Reagente 2 em 1ml de Reagente 1, misturar minuciosamente. Essa solução de trabalho se mantém estável por 1 dia.
3. Misturar 1 gota (10µl) de esperma com 1 gota de (10µl) solução de trabalho, usando o limite da lamínula. Misturar minuciosamente por, pelo menos 1 minuto.
4. Esperar 1 minuto. Cobrir com a lamínula o topo da mistura, evitar bolhas de ar. A formação de pequenas bolhas de ar é normal e devido a reação de peroxidase. Quanto maior a concentração de células peroxidase positivas, maior a formação de bolhas. Nota: no caso de formação excessiva de bolhas, interpretar a lâmina imediatamente.
5. Interpretar após 2 minutos, leia pelo menos 20 campos do microscópio separados e conte o número de células redondas peroxidase positivas e o número das células redondas negativas (veja capítulo na INTERPRETAÇÃO). Use uma magnificação de 400x.

É recomendável a visualização do vídeo de demonstração (download via link em nosso website, ou escanear código de barras):



CALCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GLÓBULOS BRANCOS PEROXIDASE POSITIVOS

1. Calcule a proporção de células peroxidase positivas como segue:

$$\text{PROPORÇÃO DE CÉLULAS REDONDAS POSITIVAS} = \frac{\text{Número de células redondas POSITIVAS}}{\text{Número de células redondas POSITIVAS} + \text{Número de células redondas NEGATIVAS}}$$

2. Agora calcule a concentração de leucócitos peroxidase positivas na amostra de Sêmen como segue:

$$\text{CONCENTRAÇÃO (mill/ml)} = \text{Proporção de células redondas positivas} \times \text{concentração total de células redondas}$$

Exemplo:

- Concentração total de células redondas é 2 mil/ml (determinada durante a análise de concentração espermática)
- Com o teste do LeucoScreen, 120 células redondas foram encontradas positivas e 80 células redondas negativas
- Proporção de células redondas positivas = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$

- Concentração de leucócitos peroxidase positivos = $0,6 \times 2 \text{ mill/ml} = 1,2 \text{ mill/ml}$

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Reagentes de armazenamento entre 2°C-25°C. Adequado para o transporte ou armazenamento de curto prazo a temperaturas elevadas (até 5 dias a 37°C). Não congele. O kit é estável por pelo menos 12 meses após a data de produção (mesmo após aberto), não use após a data de validade mencionada na etiqueta. A solução de trabalho pode ser estocada mais de 24 horas no escuro e temperatura ambiente.

OBSERVAÇÕES

Formação de um sedimento no Reagente 1 é normal. apenas despeje o Reagente 1 em um filtro de papel para eliminar o sedimento.

Em caso de a concentração de células redondas não ter sido determinada na amostra (deleção da 1a etapa do método, que não é recomendado), é possível calcular a concentração de leucócitos peroxidase positivos baseado no número dessas células contadas por campo microscópico. Para esse fim, é importante que o volume exato da mistura de Sêmen examinada em um campo do microscópio tenha sido feito. Esse volume expressado em µl é calculado como segue:

- Medir o diâmetro de um campo microscópico com um micrometro. Calcular o raio:

$$r = \text{raio (mm)} = \left(\frac{\text{diâmetro } (\mu\text{m})}{2}\right) / 1000$$
- Calcular a profundidade da amostra: distância entre lente objetiva:

$$D = \text{profundidade (mm)} = \frac{\text{Volume da mistura de sêmen (20 } \mu\text{l)}}{\text{Longitude (mm)} \times \text{largura (mm) da laminula}}$$
- $V = \text{Volume em um campo do microscópio (ul)} = \text{Profundidade} \times \text{Raio}^2 \times 3.14$

Verificar, pelo menos, 20 microscópios diferentes e contar o número de GB peroxidase positivos. Faça os seguintes cálculos:

- A = média de número de células positivas por campo microscópico
- N = Número de células positivas por mistura de Sêmen (células/ml) = $A/V \times 10^3$
- Concentração de leucócitos peroxidase positivos em amostra de Sêmen nativo (células/ml): $2 \times N$

Exemplo:

- Diâmetro do campo microscópico = 250 μm \rightarrow raio = 0.125 mm
- Lentes objetivas = 24x40mm $\rightarrow D = [20/(24 \times 40)] = 0.0208$ mm
- $V = 0.0208 \times 0.125^2 \times 3.14 = 0.00102$ μl
- 100 GB peroxidase positivos contados em 20 campos microscópicos $\rightarrow A = 5$
- $N = 5/0.00102 \times 10^3 = 4\,900\,000$ células/ml
- Concentração peroxidase positivos GB em sêmen nativo = $2 \times 4.900.000 = 9.800.000$ células/ml

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Esse teste tem como objetivo o diagnóstico de infertilidade masculina, como outros testes biológicos, a interpretação dos resultados deve ser feita dentro da estrutura dos achados clínicos e dados da história. LeucoScreen cora somente GB peroxidase positivos, outros tipos de GB (ex. linfócitos e monócitos) não podem ser detectados.

PERFORMANCES

A sensibilidade e especificidade para leucocitospermia é 90% quando comparada com o teste imunohistológico¹², com limiar para marcação da peroxidase de 1 milhão GB/ml e para o teste imunohistoquímico de 2 milhões GB/ml. O kit de LeucoScreen pode distinguir entre células peroxidase positivas e células redondas negativas com um inter e intra-ensaio CV abaixo de 10%.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Todas as amostras de sêmen devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Manejar todas as amostras como potenciais transmissores de HIV ou hepatites.

O Reagente 1 é altamente venenosos por via inalatória, pelo contato com a pele e por ingestão. Há risco de dano irreparável. Usar o vestuário proteção e retirar o contaminado imediatamente. Trabalhar sob exaustor. No caso de qualquer acidente, procurar assistência médica. Reagente 2 é corrosivo e causa queimaduras. Após contato com a pele, lavar imediatamente com água e sabão. Usar proteção para olhos e face.

BIBLIOGRAFIA

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-36.
2. Aitken, R.J., West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-51.
3. Barratt, C.L.R., Bolton, A.E., Cooke, I.D. (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5:639-44.
4. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition (2010), p. 102-107.
5. Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41:183-7.
6. Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A., Anderson, D.J. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47:460-5.
7. Johansson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. (2000) Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*, 6(4):404-12.
8. Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 63;1143.
9. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J. Androl*: 22: 573-583.
10. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia*; 35:271-278.
11. Endtz, A.W. (1972) Een methode om het vochtige urinesediment en het vochtige menselijke sperma rechtstreeks te kleuren. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 116(17): 681-5.

12. Politch, J.A., et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60(2): 372-5.



FertiPro N.V., Industriepark Noord 32, 8730 Beernem, Belgium. URL: <http://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com

Importador Brazil:

INTERMEDICAL EQUIPAMENTOS UROLÓGICOS LTDA
RUA PAISSANDU 288 – LARANJEIRAS
RIO DE JANEIRO-RJ
CEP: 22210-080
01.856.395/0001-91

Se ocorrer problemas usando este produto, favor entrar em contato com nosso Atendimento ao Consumidor – (021) 2196-6100.

REGISTRO ANVISA N.º: 80308320059 (LeucoScreen), Classe I.

RESPONSÁVEL TÉCNICO in Brazil: Ronaldo Reis Fontoura - CRM 5251022-5