



LeucoScreen Plus

Kit histoquímico semicuantitativo para la determinación de leucocitos peroxidasa positivos en semen humano

IVD

N.º de documento: FP09 I111 R01 B.2
Actualización: 14/05/2024

MATERIAL INCLUIDO

Número de catálogo
LeucoScreen Plus

LEUCO_PLUS	LeucoScreen Plus – 40 days of analysis
------------	--

ATENCIÓN AL CLIENTE/ASISTENCIA TÉCNICA

FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem / Belgium
Tel +32 (0)50 79 18 05
Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: www.fertipro.com
E-mail: info@fertipro.com



LeucoScreen Plus

Para uso diagnóstico in vitro
Reactivo para uso profesional únicamente

INFORMACIÓN GENERAL

La mayoría de los eyaculados humanos contienen leucocitos, cuya forma predominante en el semen humano son los granulocitos peroxidasa positivos⁽¹⁻⁴⁾.

La presencia excesiva de estas células (leucocitoespermia) puede indicar la existencia de infección del aparato reproductor. La leucocitoespermia también puede asociarse a defectos en el perfil del semen (reducción de la movilidad espermática y de la integridad del ADN, aumento de la viscosidad espermática, así como la pérdida de la función espermática como resultado del estrés oxidativo o la secreción de citocinas citotóxicas por parte de estos leucocitos)^(5,6). Si bien la leucocitoespermia no es un indicador absoluto de infertilidad, esta afección se ha observado por término medio entre un 10 % y un 20 % de todos los hombres infértiles⁽⁷⁾.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la presencia de más de un millón de leucocitos peroxidasa positivos por ml de eyaculado se considera anormal y se etiqueta como «leucocitoespermia»⁽⁴⁾. Sin embargo, este umbral es objeto de debate, puesto que hay quienes consideran este valor demasiado bajo y quienes lo consideran demasiado alto. De hecho, se han notificado niveles umbral de $0,2 \times 10^6$ – 2×10^6 ⁽⁷⁻⁹⁾.

Cuando se supera el umbral de un millón de leucocitos peroxidasa positivos por ml de eyaculado, deben realizarse análisis microbiológicos para investigar si existe una infección de la glándula accesoria. La evaluación de los marcadores de la glándula accesoria puede proporcionar información útil sobre el funcionamiento adecuado del epidídimo (EpiScreen Plus, FertiPro NV), las vesículas seminales (Fructose Test, FertiPro NV) o la próstata. Cabe destacar que la ausencia de leucocitos no excluye la posibilidad de una infección de la glándula accesoria.

USO PREVISTO

LeucoScreen Plus es un kit histoquímico y diagnóstico semicuantitativo no automatizado para la determinación de leucocitos peroxidasa positivos en semen humano.

El número de pruebas que pueden realizarse con el kit LeucoScreen Plus no está especificado; en cambio, el kit ha sido diseñado para 40 días de análisis durante la vida útil del kit (pueden elaborarse 20 soluciones de trabajo, que son estables durante 2 días consecutivos).

MATERIAL INCLUIDO CON LA PRUEBA

Reactivo 1 - 6 ml de solución de sustrato (4-CN en metanol)
Reactivo 2 - 300 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %
Reactivo 3 - 22 ml de solución tampón
Reactivo 4 - 1.2 ml de solución de contratinción

Certificado de análisis y fichas de datos de seguridad (FDS) de los materiales disponibles previa solicitud o descargables desde el sitio web (www.fertipro.com).

MATERIAL NECESARIO, PERO NO SUMINISTRADO

Portaobjetos, cubreobjetos, tubos de ensayo (Eppendorf), pipetas, microscopio de campo brillante.

Nota: *Se recomienda el uso de un microscopio óptico en lugar de un microscopio con contraste de fase, ya que este último puede generar dificultades de interpretación.*

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Cuando se realiza un análisis de semen rutinario, resulta muy difícil diferenciar los leucocitos de otros tipos de células redondas en la muestra de semen (por ejemplo, las células madre espermatogénicas⁽¹⁰⁾). LeucoScreen Plus aprovecha la actividad peroxidasa intrínseca de determinados leucocitos y puede utilizarse, por lo tanto, para diferenciar los leucocitos peroxidasa positivos [p. ej., granulocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos] de otros tipos de células redondas en una muestra de semen humano.

En presencia del reactivo 2 (H₂O₂), la mieloperoxidasa de los gránulos de los leucocitos oxidará el reactivo 1 (4-CN) dando lugar a un precipitado morado-azulado (4-cloro-1-naftol). El reactivo 4 contiene una solución de contratinción para facilitar la diferenciación entre las células redondas peroxidasa positivas y las células redondas peroxidasa negativas.

METHOD

Antes de utilizar el kit LeucoScreen Plus, le recomendamos encarecidamente que siga el programa de formación y que visualice el vídeo de demostración, ambos disponibles en nuestro sitio web. También puede descargar el vídeo escaneando este código QR:



Tipos de muestras

La prueba debe realizarse con muestras de semen humano fresco que contengan más de 1×10^6 células redondas por ml.

Recogida de muestras

Deben utilizarse recipientes de recogida de semen estándar cuando el semen se recoge por masturbación. Los recipientes suelen ser de polipropileno y se ha comprobado la supervivencia y la movilidad del esperma. Cuando se desaconseja la recogida del semen por masturbación, deben utilizarse preservativos de plástico no tóxico para los espermatozoides. Mantenga el recipiente de recogida de semen a temperatura ambiente antes de añadir la muestra de semen para evitar grandes cambios de temperatura que puedan afectar a los espermatozoides. La prueba debe realizarse el mismo día de la recogida del semen.

Advertencias antes del uso

No utilice el producto si el precinto de los frascos está abierto o si presenta defectos cuando se le entrega el kit.

Preparación de los reactivos

El reactivo 1 debe contener un fluido transparente; no utilizar si el fluido se ha vuelto amarillento.

Método

1. Cuente el número de células redondas al mismo tiempo que determina la concentración espermática durante el análisis de semen rutinario. Calcule y anote la concentración total de células redondas en mill./ml, puesto que la necesitará para el cálculo de la concentración de leucocitos peroxidasa positivos. La prueba LeucoScreen Plus está indicada cuando la concentración de células redondas supera los 1×10^6 por ml.
2. Prepare la solución de trabajo: Añada los siguientes volúmenes en un tubo Eppendorf y mezcle bien.
 - o 200 µl de reactivo 1
 - o 5 µl de reactivo 2
 - o 1 ml de reactivo 3
 Esta solución de trabajo es estable durante 48 horas cuando se conserva entre 2 y 8 °C, protegida de la luz (solar).
3. Tome 10 µl de la muestra de semen y añada 20 µl de la solución de trabajo. Mezcle bien.
4. Incube durante dos minutos a temperatura ambiente **en la oscuridad.**

- Transfiera 10 µl de la mezcla al centro de un portaobjetos y añada 10 µl del reactivo 4. Mezcle bien usando el borde del cubreobjetos.
- Cubra la mezcla con el cubreobjetos.
- Cuente y clasifique un total de 200 células redondas utilizando un aumento de 400x. Escanee diferentes campos microscópicos (preferiblemente 20).
- Después de cada prueba, elimine todos los reactivos y materiales utilizados.

Nota: En algunas muestras de semen, quizá prefiera enriquecer la concentración de células redondas para facilitar el recuento celular. Para ello, centrifugue la muestra durante 15 minutos a 350 G, elimine parte del volumen de la muestra de semen y vuelva a poner en suspensión el sedimento.

En el caso de concentraciones muy elevadas de células redondas (esto es, por encima de 20×10^6 por ml), se recomienda encarecidamente diluir la muestra en PBS o en un medio de lavado FertiCult™.

INTERPRETACIÓN

- Células redondas peroxidasa positivas: contienen gránulos negros (azulados) y tienen un citoplasma de color gris antracita. Esta zona de color antracita puede cubrir toda la célula o solo parte de ella.
- Células redondas peroxidasa negativas: permanecen sin teñirse o pueden presentar color rosa. Los gránulos que se aprecian en las células no teñidas no están rodeados por el color antracita típico observado en las células positivas.

CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LEUCOCITOS PEROXIDASA POSITIVOS

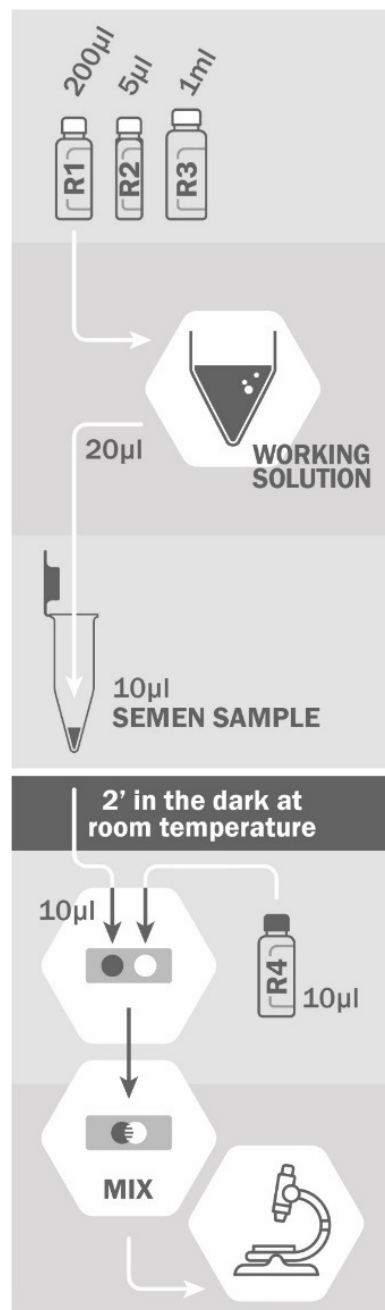
- Calcule la proporción de células peroxidasa positivas de la siguiente forma:

$$\text{PROPORCIÓN DE CÉLULAS REDONDAS POSITIVAS} = \frac{\text{Number of POSITIVE round cells}}{(\text{Number of POSITIVE round cells} + \text{Number of NEGATIVE round cells})}$$

- Ahora, calcule la concentración de leucocitos peroxidasa positivos en la muestra de semen de la siguiente forma:

$$\text{CONCENTRACIÓN (mill./ml)} = \text{Proporción de células redondas positivas} \times \text{concentración total de células redondas}$$

Presentación gráfica del protocolo:



Ejemplo:

- La concentración total de células redondas es 2 mill./ml (determinada durante el análisis de la concentración espermática)
- Con la prueba LeucoScreen Plus, se descubren 120 células redondas positivas y 80 células redondas negativas
- Proporción de células redondas positivas = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Concentración de leucocitos peroxidasa positivos = $0.6 \times 2 \text{ mill./ml} = 1.2 \text{ mill./ml}$

El reactivo 1 contiene metanol: líquido y vapores muy inflamables, tóxico en caso de ingestión, en caso de contacto con la piel o en caso de inhalación, provoca daños en los órganos.

El reactivo 2 contiene H₂O₂: dañino en caso de ingestión o inhalación; provoca lesiones oculares graves. Llevar protección para los ojos/la cara.

El reactivo 3 contiene ProClin 950: provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves, puede provocar una reacción alérgica en la piel.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

Esta prueba sirve de ayuda en el diagnóstico de la infertilidad masculina y, al igual que otras pruebas biológicas, la interpretación de los resultados debe realizarse en el marco de los hallazgos clínicos y los datos de la anamnesis. La prueba LeucoScreen Plus solo tiñe leucocitos peroxidasa positivos y no detecta otro tipo de leucocitos (p. ej., linfocitos y monocitos).

Todas las muestras de semen deben considerarse como potencialmente infecciosas. Manipular todas las muestras como si fueran posibles transmisoras del VIH o la hepatitis. Utilizar siempre puntas de pipeta nuevas para cada paso con el fin de evitar la contaminación cruzada. No desechar el producto en el medio ambiente.

Cualquier incidente grave (tal como se define en el Reglamento [UE] 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro) debe notificarse a FertiPro N.V. y, si procede, a la autoridad competente del Estado miembro de la UE en el que esté establecido el usuario o paciente.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Repetibilidad y reproducibilidad: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$
 Valor predictivo positivo: 88 %; valor predictivo negativo: 96 %

CONSERVACIÓN/ELIMINACIÓN

- El kit es estable durante, al menos, 12 meses tras la fecha de producción (incluso una vez abierto)
- No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto
- Almacenar los reactivos a una temperatura de entre 2 °C y 25 °C.
- No congelar
- Proteger de la luz (solar)
- Los frascos deben conservarse bien cerrados en todo momento
- La solución de trabajo puede conservarse hasta 48 horas a 2-8 °C, protegida de la luz (solar)
- Los reactivos deben eliminarse de conformidad con la normativa local para la eliminación de productos sanitarios.

PRECAUCIONES

Se recomienda la utilización de guantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril.* 1988;49(3):497-504.
2. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl.* 1990;13(6):433-51.
3. Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod.* 1990;5(6):639-48.
4. Geneva: World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021; sixth edition.
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183-97.
6. Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril.* 1987;47(3):460-5.
7. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1143-57.
8. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
9. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
10. Johanisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update.* 2000;6(4):404-12.

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

Símbolos definidos en la norma ISO 15223

	Número de catálogo
	Número de lote
	Consulte las instrucciones de uso
	Fabricante
	Diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura
	Fecha de caducidad
	Mantener alejado de la luz (solar)
Símbolo definido en el Reglamento (UE) n.º 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro	



Marcado CE por la Entidad notificada n.º 2797

Símbolo definido en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008 [CLP]

	GHS08 Riesgo grave para la salud
	GHS02 Líquido inflamable
	GHS06 Toxicidad aguda
	GHS07 Riesgo para la salud
	GHS05 Corrosivo/irritante para la piel