

# LeucoScreen Plus



Kit histoquímico semi-quantitativo para determinação de células brancas

peroxidase positivas no sêmen humano

Ref. doc: FP09 I111 R01 A.4 Atualização: 1/02/2021

Uso destinado a diagnóstico *in vitro* – Reagente para uso profissional

## INTRODUÇÃO

A maioria dos ejaculados humanos contém leucócitos e a forma predominante de leucócitos no sêmen humano são granulócitos peroxidase positivos<sup>1,2,3,4</sup>. A presença excessiva dessas células (leucoespermia) pode indicar a existência de uma infecção no trato reprodutivo. A leucoespermia também pode estar associada a defeitos no perfil do sêmen (redução da motilidade do espermatozoide e integridade do DNA, aumento da viscosidade do espermatozoide, assim como perda de função do espermatozoide como resultado do estresse oxidativo e/ou secreção de citocinas citotóxicas por esses leucócitos). Apesar de a leucoespermia não ser uma indicação absoluta de infertilidade, essa condição é observada em uma média de 10 a 20% dos homens inférteis<sup>5</sup>.

Quando uma análise típica de sêmen é feita, é muito difícil de diferenciar células brancas de outros tipos de células redondas na amostra de sêmen (por exemplo células precursoras da espermatogênese<sup>7</sup>). Um método relativamente rápido e barato de diferenciar células brancas peroxidase positivas de outras células redondas em uma amostra de sêmen consiste no uso da atividade de peroxidase dessas células<sup>7</sup>. LeucoScreen Plus é como o teste LeucoScreen, baseado na mesma técnica, e assim pode ser usado para marcar células brancas peroxidase positivas em uma amostra de sêmen.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a presença de mais de um milhão e células brancas peroxidase positivas (WBC) por mL de ejaculado é considerado anormal e classificado como "leucoespermia"<sup>4</sup>. Contudo, esse limite está sob debate, já que alguns consideram esse valor muito alto e outros muito baixo. De fato, valores de  $0.2 \times 10^6$  –  $2 \times 10^6$  já foram registrados<sup>8-10</sup>.

Quando o limite de um milhão de WBC peroxidase positivas por ml de ejaculado é ultrapassado testes microbiológicos devem ser realizados para investigar se há infecção de glândula acessória. Estudos de marcadores de glândulas acessórias podem fornecer informações úteis adicionais sobre o funcionamento adequado do epidídimo (EpiScreen Plus, FertiPro nv), vesícula seminal (Fructose Test, FertiPro nv) ou próstata. Sobretudo, a ausência de leucócitos não é capaz de excluir a possibilidade de uma infecção de glândula acessória.

O número de testes que podem ser realizados com o kit LeucoScreen Plus não é indicado, mas o kit foi desenvolvido para 40 dias de análises durante o período de validade do kit (podem ser feitas 20 soluções de trabalho, que são estáveis por 2 dias consecutivos).

## MATERIAL INCLUÍDO COM O TESTE

- Reagente 1 – 6 ml de solução substrato (4-CN em metanol)
- Reagente 2 – 300 µl de peróxido de hidrogênio 30%
- Reagente 3 – 22 ml de solução tampão
- Reagente 4 – 1.2 ml de solução corante de contraste

O certificado de análise e MSDS estão disponíveis no website ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

## MATERIAL NÃO INCLUÍDO COM O TESTE

Lâminas de microscópio, lentes objetivas, tubos de ensaio (ependorf), pipetas, campo microscópico iluminado.

**Nota:** Recomenda-se usar um microscópio óptico e não um microscópio de contraste de fase, pois este pode levar a problemas de interpretação.

## TIPO DE ESPÉCIME

O teste deve ser realizado em amostras de sêmen humano fresco contendo mais de  $1 \times 10^6$  células redondas por mL. O teste deve ser realizado dentro do mesmo dia da coleta do sêmen.

## PRINCÍPIO DO TESTE

Mieloperoxidase presente nos grânulos de certos leucócitos, oxidam 4-CN para um precipitado roxo-azulado 4-cloro-1-nafton, usando  $H_2O_2$  como oxidante. O Reagente 4 contém uma solução de corante de contraste que facilita a diferenciação entre células redondas peroxidase positivas e negativas.

## INTERPRETAÇÃO

- **Células redondas peroxidase positivas:** contém grânulos preto(azulados) e têm um citoplasma cinza-antracite. Essa área antracite pode cobrir toda a célula ou apenas uma parte dela.
- **Células redondas peroxidase negativas:** permanecem sem coloração ou podem ser rosas. Grânulos vistos em células não coradas não são envoltos pela típica coloração antracite, vista nas células positivas.

## PERFORMANCE

Em estudo de validação independente, 44 amostras foram analisadas por operadores diferentes com o LeucoScreen e LeucoScreen Plus. Peculiaridades de performance:

- **Acurácia:** Ambos os kits forneceram resultados comparáveis, baseado na análise PassingBablok.
- **Precisão:** Ambos os kits podem distinguir entre células redondas peroxidase positivas e negativas com precisão comparável (LeucoScreen Plus: CV<sub>intra</sub>: 12%; CV<sub>inter</sub>: 10%)

## CHEGAGENS PRÉ-USO

O Reagente 1 deve conter líquido claro, não usar o kit se o líquido se tornar amarelo.

## MÉTODOS

Antes do primeiro uso do kit LeucoScreen Plus, é fortemente recomendável seguir o programa de treinamento e assistir ao vídeo demonstração, ambos disponíveis em nosso site. O vídeo pode ser também baixado através desse QR-código:



1. Contar o número de células redondas enquanto determina a concentração de espermatozoide durante a rotina de análise do sêmen. Calcular e escrever a concentração total de células redondas em mill/mL, já que isso será necessário para o cálculo da concentração de células brancas peroxidase positivas. Quando a concentração de células redondas exceder  $1 \times 10^6$  por mL, o teste LeucoScreen Plus é indicado.
2. Preparar a solução de trabalho: Adicionar os seguintes volumes a um tubo Eppendorf e misturar completamente.
  - 200 µl Reagente 1
  - 5 µl Reagente 2
  - 1 ml Reagente 3Essa solução de trabalho é estável por 48 horas quando armazenada entre 2-8°C, protegida da luz (solar).
3. Pegar 10 µl da amostra de sêmen e adicionar 20 µl da solução. Misturar cuidadosamente.
4. Incubar por 2 minutos em temperatura ambiente **no escuro**.
5. Transferir 10 µl da mistura para o meio de uma lâmina de microscópio e adicionar 10 µl do Reagente 4. Misturar completamente usando a borda da lâmina.
6. Cobrir com a lâmina
7. Contar e classificar um total de 200 células redondas usando uma magnificação de 400x. Varrer diferentes campos microscópicos (preferencialmente 20).

**Nota:** Em algumas amostras de sêmen, pode-se preferir enriquecer a concentração de células redondas para facilitar a contagem celular. Para isso, deve-se centrifugar a amostra por 15 minutos a 350g, remova algum volume da amostra de sêmen e ressuspenda o precipitado (pellet).

No caso de altíssima concentração de células redondas (i.e. acima de  $20 \times 10^6$  por ml), é altamente recomendável diluir a amostra em PBS ou por meio de lavagem, FertiCult™ Flushing médium.

## CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS BRANCAS PEROXIDASE POSITIVAS

- Calcular a proporção de células peroxidase positivas como demonstrado abaixo:

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

- Calcular a concentração de células brancas peroxidase positivas na amostra de sêmen como demonstrado a seguir:

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

Exemplo:

- Concentração total de células redondas é de 2 mill/mL (determinado durante a análise de concentração do esperma)
- Com o teste LeucoScreen Plus, 120 células redondas foram positivas e 80 células redondas foram negativas
- Proporção de células redondas positivas =  $120/(120+80) = 0,6$
- Concentração de céls brancas peroxidase positivas =  $0,6 \times 2 \text{ mill/mL} = 1,2 \text{ mill/mL}$

## ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Armazenar os reagentes entre 2°C-25°C. Adequado para transporte de curta duração a temperaturas elevadas (até 5 dias a 37°C). Não congelar. Proteger da luz (solar). O kit é estável por, pelo menos, 12 meses após data de fabricação (mesmo depois de aberto), não usar após a data de validade mencionada no rótulo do produto. Os frascos devem ser mantidos fechados firmemente por todo o tempo. A solução de trabalho pode ser armazenada por até 48 horas a 2-8°C, protegida de luz (solar).

## LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Esse teste é um auxílio no diagnóstico da infertilidade masculina e, assim como para outros testes biológicos, sua interpretação de resultados deve ser realizada em um contexto de achados clínicos e anamnese. O teste LeucoScreen Plus somente cora WBC peroxidase positivos, outros tipos de WBC (ex. linfócitos e monócitos) não são detectados.

## AVISOS E PRECAUÇÕES

É recomendado o uso de luvas. O Reagente 1 contém metanol: evitar a inalação de vapores. O Reagente 2 contém  $H_2O_2$ : corrosivo, causa queimaduras. Depois do contato com a pele, lavar imediatamente com água e sabão. Usar proteção ocular/facial. Todas as amostras de sêmen devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Lidar com todos os espécimes como capazes de transmitir HIV ou hepatites. Sempre usar pontas de pipetas novas para cada passo para evitar contaminação cruzada. Não descartar o produto no meio ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 49(3): 497-504
2. Aitken, R.J., West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13 (6):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(6):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(1):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(3):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. *Andrologica*; 35:271-278.



FertiPro nv, Industriepark Noord 32,  
8730 Beernem, Bélgica.  
URL: <https://www.fertipro.com>  
E-mail: [info@fertipro.com](mailto:info@fertipro.com)



LEUCO\_PLUS