

LeucoScreen Plus

Kit histoquímico semi-quantitativo para determinação de células brancas peroxidase positivas no sêmen humano

IVD

Documento referência: FP09 I111 R01 B.2

Atualização: 14/05/2024

MATERIAL INCLUSO

Número do catálogo

LeucoScreen Plus

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

APOIO AO CLIENTE-TÉCNICO

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

Uso destinado a diagnóstico in vitro

Reagente para uso profissional

INFORMAÇÕES GERAIS

A maioria dos ejaculados humanos contém leucócitos e a forma predominante de leucócitos no sêmen humano são granulócitos peroxidase positivos⁽¹⁻⁴⁾. A presença excessiva dessas células (leucocitospermia) pode indicar a existência de uma infecção no trato reprodutivo. A leucocitospermia também pode estar associada a defeitos no perfil do sêmen (redução da motilidade do espermatozóide e integridade do DNA, aumento da viscosidade do espermatozóide, assim como perda de função do espermatozóide como resultado do estresse oxidativo e/ou secreção de citocinas citotóxicas por esses leucócitos)^(5, 6). Apesar de a leucospermia não ser uma indicação absoluta de infertilidade, essa condição é observada em uma média de 10 a 20% dos homens inférteis⁽⁷⁾.

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 “leucocitospermia”⁽⁴⁾. Contudo, esse limite está sob debate, já que alguns consideram esse valor muito alto e outros muito baixo. De fato, valores de 0.2×10^6 – 2×10^6 já foram registrados⁽⁷⁻⁹⁾.

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.

USO PRETENDIDO

LeucoScreen Plus é um kit semiquantitativo, não automatizado, histoquímico e para diagnóstico para determinação de células brancas peroxidase positivas no sêmen humano.

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

Um certificado de análise e FISPQ estão disponíveis mediante solicitação ou podem ser baixados de nosso site (www.fertipro.com).

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

Lâminas de microscópio, lentes objetivas, tubos de ensaio (Eppendorf), 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*

PRINCÍPIO DO TESTE

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⁽¹⁰⁾). O LeucoScreen Plus faz uso da atividade de peroxidase intrínseca de determinadas células brancas e, portanto, pode ser usado para diferenciar as células brancas peroxidase positivas (por exemplo, granulócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos) em uma amostra de sêmen humano de outros tipos de células redondas.

Na presença do Reagente 2 (H₂O₂), a mieloperoxidase nos grânulos de leucócitos oxidará o Reagente 1 (4-CN) em um precipitado roxo-azulado (4-cloro-1-nafton). O Reagente 4 contém uma solução de corante de contraste que facilita a diferenciação entre células redondas peroxidase positivas e negativas.

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-code:



Tipo de espécime

O teste deve ser realizado em amostras de sêmen humano fresco contendo mais de 1×10^6 células redondas por ml.

Coleta e preparação das amostras

Recipientes padrão de coleta de sêmen devem ser usados, tipicamente em polipropileno e sobrevivência/motilidade espermática testada, quando o sêmen é coletado por masturbação. Preservativos de plástico não tóxicos para o sêmen devem ser usados quando a coleta de sêmen por masturbação não for possível. Mantenha o recipiente de coleta de sêmen em temperatura ambiente antes de adicionar a amostra de sêmen para evitar grandes mudanças de temperatura que possam afetar os espermatozoides. O teste deve ser realizado dentro do mesmo dia da coleta do sêmen.

Avisos antes da utilização

Não utilize o produto se o selo das garrafas estiver aberto ou defeito quando o kit é for entregue.

Preparação dos reagentes

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

Métodos

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 1×10^6 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.
 - o 200 µl Reagente 1
 - o 5 µl Reagente 2
 - o 1 ml Reagente 3
 Essa 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 lamínula.
6. Cobrir com a lamínula.
7. Contar e classificar um total de 200 células redondas usando uma magnificação de 400x. Varrer diferentes campos microscópicos (preferencialmente 20).

8. Após cada teste individual, descarte todos os reagentes e materiais usados.

Note: 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 20×10^6 por ml), é altamente recomendável diluir a amostra em PBS ou por meio de lavagem, FertiCult™ Flushing médium

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.

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS BRANCAS PEROXIDASE POSITIVAS

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

PROPORÇÃO DE CÉLULAS REDONDAS PEROXIDASE POSITIVAS =

$$\frac{\text{Número de células redondas POSITIVAS}}{(\text{Número de células redondas POSITIVAS} + \text{Número de céls NEGATIVAS})}$$

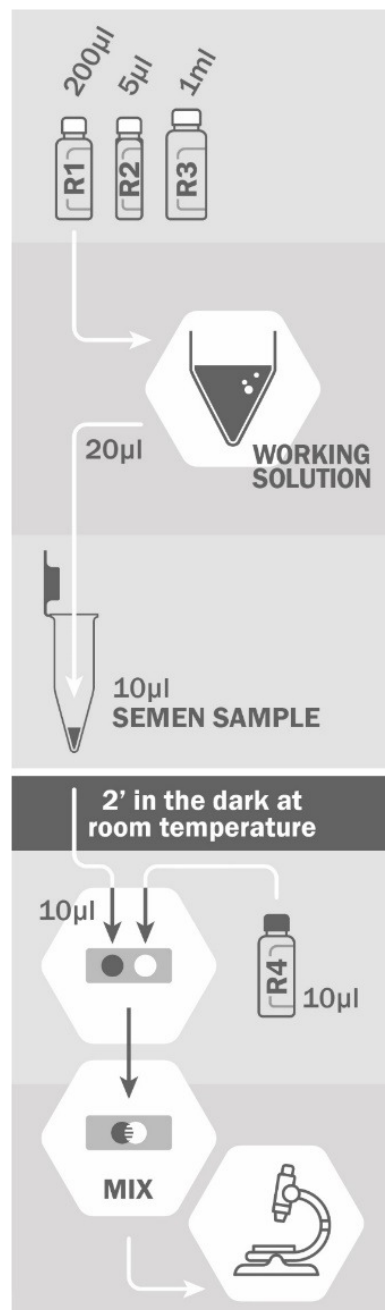
- Calcular a concentração de células brancas peroxidase positivas na amostra de sêmen como demonstrado a seguir:

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

Exemplo:

- Concentração total de células redondas é de 2 mil/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 = $0.6 \times 2 \text{ mil/ml} = 1.2 \text{ mil/ml}$

Apresentação gráfica do protocolo:



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.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Repetibilidade e reprodutibilidade : $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Porcentagem de concordância positiva: 88% -
Porcentagem de concordância negativa: 96%

ARMAZENAMENTO / DESCARTE

- 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
- Armazenar os reagentes entre 2°C e 25°C
- Não congelar
- Proteger da luz (solar)
- 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)
- Os reagentes devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais para o descarte de dispositivos médicos

PRECAUÇÕES

É recomendado o uso de luvas.

O *Reagente 1* contém metanol: líquido e vapor facilmente inflamáveis, tóxico por ingestão, tóxico em contacto com a pele, tóxico por inalação, afeta os órgãos.

O *Reagente 2* contém H₂O₂: nocivo por ingestão, nocivo por inalação, Provoca lesões oculares graves. Usar proteção ocular/facial.

O *Reagente 3* contém ProClin 950: provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves, pode provocar uma reação alérgica cutânea.

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.

Qualquer incidente grave (conforme definido no "Regulamento Europeu de Dispositivos Médicos para Diagnóstico In Vitro 2017/746) que tenha ocorrido, deve ser relatado à FertiPro NV e, se aplicável, à autoridade competente do Estado Membro da UE em que o usuário e/ou paciente está estabelecido.

ANVISA

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.

RESPONSÁVEL TÉCNICO in Brazil:







Ronaldo Reis Fontoura - CRM 5251022-5
Registro: 80308320078

BIBLIOGRAFIA


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. Johansson 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.

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Símbolos conforme definido pela norma ISO 15223

	Número do catálogo
	Código do lote
	Consulte as instruções de uso
	Fabricante
	Diagnóstico in vitro
	Limite de temperatura
	Data de validade
	Mantenha afastado da luz (do sol)

Símbolo conforme definido pela norma IVDR 2017/746

	Marcação CE por Órgão Notificado 2797
---	---------------------------------------

Símbolo definido conforme a Norma (EC) No. 1272/2008 [CLP]

	GHS08 Perigo grave para a saúde
	GHS02 Líquido inflamável
	GHS06 Toxicidade aguda
	GHS07 Perigo para a saúde
	GHS05: Corrosão/irritação cutânea