LeucoScreen Plus

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



MATERIAL INCLUÍDO

Número de catálogo
LEUCO_PLOS — LeucoScreen Plus – 40 days of analysis

INFORMAÇÕES GERAIS

A maioria dos ejaculados humanos contém leucócitos. Sendo os granulócitos peroxidase positivos (PMN) a forma predominante. A presença excessiva dessas células (chamada leucocitospermia) pode indicar a existência de uma infecção no trato reprodutivo. A leucocitospermia também pode estar associada a defeitos no perfil de membrana celular dos espermatozoides e integridade do DNA, aumento da viscosidade seminal, assim como perda de função de espermatozoides como resultado ao estresse oxidativo e/ou secreção de citocinas, citotoxicidade desses leucócitos. Apesar da leucocitospermia não ser uma indicação absoluta de infertilidade, essa condição é observada em uma média de 10 a 20% dos homens inférteis.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a presença de mais de um milhão de células brancas peroxidase positivas (WBC) por mL de ejaculado é considerada anormal e clinicamente significativa (leucocitospermia). Contudo, este limite está sob debate, já que alguns consideram esse valor muito alto e outros muito baixo. De fato, valores de 0.2×10^6–1×10^6 por mL têm sido propostos.

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 glândulas acessórias. Testes de imagem das glândulas acessórias podem fornecer informações adicionais sobre o funcionamento adequado do epidídimo (Epididymis Function Profile), vesícula seminal (Fructose Test, Fertipro NV) ou próstata. Sobretudo, a ausência de leucócitos não é capaz de excluir a possibilidade de uma infecção de glândulas acessórias.

USO PRETENDIDO

LeucoScreen Plus é um kit semi-quantitativo, 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 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 fixante de contraste

Um certificado de análise e FISPQ estão disponíveis mediante solicitação ao fabricante ou podem ser baixados no site (www.fertipro.com).

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Lâminas de microscópio, lentes objetivas, tubos de ensaio (Eppendorf), pipetas, microscópio óptico.
- Nota: Recomenda-se usar um microscópio óptico e não um microscópio de contraste de fase, pois este pode levar a problemas na interpretação.

PRINCÍPIO DO TESTE

Quando uma análise típica de sêmen é feita, é muito difícil diferenciar células brancas de outros tipos de células redondas na amostra de sêmen (por exemplo células precursoras da espermatogênese). 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) de macrófagos em uma amostra de sêmen humano de outros tipos de células redondas. A reação do Reagente 2 (H_2O_2) e mieloperoxidase nos grânulos de leucócitos oxida o Reagente 1 (4-CN) em um precipitado roxo-azulado

(4-cloro-1-naftol). O Reagente 4 contém uma solução de contraste que facilita a diferenciação entre células redondas peroxidase positivas e negativas.

MÉTODOS

Antes do primeiro uso do kit LeucoScreen Plus, é fortemente recomendado seguir o programa de treinamento e assistir ao vídeo demonstrativo, ambos disponíveis no site do fabricante. O vídeo pode ser também obtido através do QR-code, também no site do fabricante.

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 sob condições de temperatura controlada, quando o sêmen é coletado para testes laboratoriais. Preservativos de plástico não tóxicos 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 semen 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 embalagens estiver aberto ou com defeito quando o kit 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 espermatozoides durante a rotina de análise seminal. Calcular a concentração total de células redondas em milhões/ml, já que isso será necessário para o cálculo da concentração de células brancas peroxidase positivas.
2. Quando a concentração de células redondas exceder 1×10^6 por ml, o teste LeucoScreen Plus é indicado.
3. Preparar a solução de trabalho: adicionar os seguintes volumes à um tubo Eppendorf e misturar completamente.
   - 200 µl Reagente 1
   - 5 µl Reagente 2
   - 1 ml Reagente 3

   Essa solução de trabalho é estável por 48 horas quando armazenada entre 2-8°C, protegida da luz.
4. Pipetar 10 µl de amostra de sêmen indicada em uma lâmina de microscópio e adicionar 10 µl de Reagente 4. Misturar completamente usando uma lamínula.
5. Transferir 10 µl da mistura para o meio da lâmina de microscópio e adicionar 10 µl do Reagente 4. Misturar completamente usando uma lamínula.
6. Cobrir com a lamínula.
7. Contar a classificação total de 200 células redondas usando uma magnificação de 400x. Varredura de campos microscópicos (preferencialmente 20).

INTERPRETAÇÃO

- Células redondas peroxidase positivas: contém grânulos peroxidase positivos que são tipicamente azuis. Essa área intracelular pode cobrir toda a célula ou apenas uma parte dela.
- Células redondas peroxidase negativas: permanecem sem coloração ou podem ser rosas. Grânulos violeta em células não coradas não são envoltos pela típica coloração, vista nas células positivas.

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS BRANCAS PEROXIDASE POSITIVAS

• Calcular a proporção de células peroxidase positivas por amostra de sêmen.

PROPORÇÃO DE CÉLULAS REDONDAS PEROXIDASE POSITIVAS = Número de células redondas peroxidase positivas / Número de células redondas POSITIVAS + Número de células redondas NEGATIVAS

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

CONCENTRAÇÃO (milhões/ml) = Proporção de células redondas positivas × concentração total de células redondas

Exemplo:

- Concentração total de células redondas é de 2 milhões/ml (determinado durante a análise de concentração de 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 células brancas peroxidase positivas = 0.6 × 2 milhões/ml = 1.2 milhões/ml.

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: CVw: ≤ 15%, CVb: ≤ 15%.
Porcentagem de concordância positiva: 88%.
Porcentagem de concordância negativa: 96%.

ARMAZENAMENTO / DESCARTE

- O kit é estável por, pelo menos, 12 meses após sua fabricação (mesmo depois de aberto).
- Não usar após a data de validade mencionada na rotulagem do produto.
- Armazenar os reagentes entre 2°C e 25°C.
- Não congelar.
- Proteger da luz solar.
- Os frascos devem ser mantidos fechados por todo o tempo.
- A solução de trabalho pode ser armazenada por até 48 horas a 2-8°C, protegida da 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 contato com a pele, tóxico por inalação, afeta os órgãos.
- O Reagente 2 contém H_2O_2: 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.

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:
Ronaldo Reis Fontoura – CRM 5251022-5
Registro: 80308320078

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, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021

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., Haïmovici, 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. Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. Fertil Steril, 63:1143.

8. 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.

9. Punab M, Louivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. Andrologia; 35:271-278.

10. Johannisson 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.