

## **LeucoScreen Plus**

### **KIT HISTOQUÍMICO SEMI-QUANTITATIVO PARA DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS BRANCAS PEROXIDASE POSITIVAS NO SÊMEN HUMANO "USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO"**

#### **I - NOME TÉCNICO OU NOME COMERCIAL DO PRODUTO:**

LeucoScreen Plus

#### **II - RAZÃO SOCIAL E ENDEREÇO DO FABRICANTE LEGAL, JUNTO COM UM NÚMERO DE TELEFONE OU FAX OU ENDEREÇO DE SÍTIO ELETRÔNICO ONDE SEJA POSSÍVEL OBTER ASSISTÊNCIA TÉCNICA (SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR):**

##### IMPORTADOR:

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

##### FABRICANTE LEGAL:

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

#### **III - FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO, INCLUINDO INDICAÇÃO DE QUE É PARA "USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO":**

##### 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. Isso inclui reduções no volume do ejaculado, diminuição da concentração e motilidade do espermatozóide, assim como perda de função do espermatozóide como resultado do estresse oxidativo<sup>2,5</sup> e/ou secreção de citocinas citotóxicas<sup>6</sup>. 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>8</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 (Teste da Frutose, FertiPro NV) ou próstata (Teste do Ácido Cítrico, FertiPro NV). 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.

### MÉTODO

Antes do primeiro uso do kit LeucoScreen Plus, é fortemente recomendável seguir o programa de treinamento e assistir ao vídeo demonstração, ambos disponíveis no pendrive incluso no kit. O vídeo pode ser também baixado através desse QR-code:



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 200 µl do Reagente 1, 5 µl do Reagente 2 e 1 ml do Reagente 3 a um tubo Eppendorf e misturar completamente. 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 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).
-

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 e ressuspender o pellet no volume apropriado de meio de Lavagem FertiCult™ (Flushing médium Fercult, FertiPro N.V.).

No caso de altíssima concentração de células redondas, também é possível diluir a amostra no meio de Lavagem (FertiCult™ Flushing médium).

#### **IV - USUÁRIO PRETENDIDO, QUANDO APLICÁVEL:**

LeucoScreen Plus é um método diagnóstico in vitro (IVD) somente para uso profissional. Os usuários pretendidos são profissionais de IVF (técnicos de laboratório, embriologistas ou médicos).

#### **V - INDICAÇÕES DE CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO OU DE MANUSEIO APLICÁVEIS:**

##### ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE:

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).

#### **VI - PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE OU DO INSTRUMENTO:**

##### PRINCÍPIO DO TESTE

Mieloperoxidase presente nos grânulos de certos leucócitos, oxidam 4-CN para um precipitado roxo-azulado 4-cloro-1-naftol, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante. O Reagente 4 contém uma solução de corante de contraste que facilita a diferenciação entre células redondas peroxidase positivas e negativas.

#### **VII - TIPOS DE AMOSTRAS OU MATRIZES A UTILIZAR, QUANDO APLICÁVEL:**

O teste deve ser realizado em amostras de sêmen humano fresco contendo mais de 1x10<sup>6</sup> células redondas por ml. O teste deve ser realizado dentro do mesmo dia da coleta do sêmen.

#### **VIII - CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS:**

##### COLETA

A coleta de sêmen deve ser feita em recipiente estéril e encaminhado ao laboratório. Deve ficar a temperatura ambiente até liquefação. Após liquefação, é iniciada a análise.

A amostra deve ser analisada na câmara de Makler para avaliar a concentração de células redondas. Caso a concentração de células redondas seja maior ou igual a 1 milhão de células redondas por ml, recomenda-se a análise da amostra utilizando-se o Kit Leucoscreen.

---

### MANUSEIO

A amostra deve ser manuseada com luvas e dentro de uma cabine de fluxo laminar, pois todas as amostras devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

### PREPARO DA AMOSTRA DE SÊMEN

Após liquefação a amostra deve ser processada dentro de 1 hora, para assegurar o resultado da análise.

A amostra deve ser homogeneizada com o uso de uma pipeta estéril, antes de iniciar a análise.

## **IX - DESCRIÇÃO DO PRODUTO, INCLUINDO OS ACESSÓRIOS E QUAISQUER LIMITAÇÕES PARA SEU USO, COMO UTILIZAÇÃO DE INSTRUMENTO DEDICADO, E SE APLICÁVEL, VERSÃO DO SOFTWARE:**

O kit LeucoScreen Plus consiste nos seguintes reagentes:

Código	Nome do produto - componente
LEUCO_PLUS	LEUCOP1 - Reagente 1 - Solução substrato (4-CN em metanol) - 6 ml
	LEUCOP2 - Reagente 2 - Peróxido de hidrogênio 30% - 300 µl
	LEUCOP3 - Reagente 3 - Solução tampão - 22 ml
	LEUCOP4 - Reagente 4 - Solução corante de contraste - 1.2 ml

LEUCOP1 - Reagente 1 - Solução substrato (4-CN em metanol) - 6 ml	
NOME	CAS
Methanol	(CAS No) 67-56-1 (EC no) 200-659-6 (EC index no) 603-001-00-X
4-chloro-1-naphthol	(CAS No) 604-44-4

LEUCOP2 - Reagente 2 - Peróxido de hidrogênio 30% - 300 µl	
NOME	CAS
Hydrogen peroxide 30%	(CAS No) 7722-84-1

LEUCOP3 - Reagente 3 - Solução tampão - 22 ml	
NOME	CAS
Ultrapure water	(CAS No) 7732-18-5 (EC no) 231-791-2
ProClin 950	Skin Corr. 1B, H314 Skin Sens. 1, H317 Aquatic Acute 1, H400
Sodium Chloride	(CAS No) 7647-14-5 (EC no) 231-598-3

## INSTRUÇÕES DE USO

Potassium Chloride	(CAS No) 7447-40-7 (EC no) 231-211-8
Potassium Dihydrogen Phosphate	(CAS No) 7778-77-0 (EC no) 231-913-4
Sodium Dihydrogen Phosphate Dihydrate	(CAS No) 13472-35-0
D-(+)-Glucose	(CAS No) 50-99-7 (EC no) 200-075-1
Calcium chloride dihydrate	(CAS No) 10035-04-8
Sodium Pyruvate	(CAS No) 113-24-6 (EC no) 204-024-4
Magnesium chloride hexahydrate	(CAS No) 7791-18-6
Phenol red sodium salt	(CAS No) 34487-61-1

LEUCOP4 - Reagente 4 - Solução corante de contraste - 1.2 ml	
NOME	CAS
Ultrapure water	(CAS No) 7732-18-5 (EC no) 231-791-2
Ponceau S solution	(CAS No) 6226-79-5
Sodium Chloride	(CAS No) 7647-14-5 (EC no) 231-598-3
Potassium Chloride	(CAS No) 7447-40-7 (EC no) 231-211-8
Potassium Dihydrogen Phosphate	(CAS No) 7778-77-0 (EC no) 231-913-4
Sodium Dihydrogen Phosphate Dihydrate	(CAS No) 13472-35-0
D-(+)-Glucose	(CAS No) 50-99-7 (EC no) 200-075-1
Calcium chloride dihydrate	(CAS No) 10035-04-8
Sodium Pyruvate	(CAS No) 113-24-6 (EC no) 204-024-4
Magnesium chloride hexahydrate	(CAS No) 7791-18-6
Phenol red sodium salt	(CAS No) 34487-61-1

**X - ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO, EXCETO PARA INSTRUMENTOS, INCLUINDO CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO APÓS ABERTURA DE EMBALAGENS PRIMÁRIAS, BEM COMO CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES DE TRABALHO, QUANDO RELEVANTE:**

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE:

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).

**XI - DETALHES DE QUALQUER TRATAMENTO OU MANUSEIO DOS PRODUTOS ANTES DE ESTAREM PRONTOS PARA USO, COMO INSTALAÇÃO, RECONSTITUIÇÃO, CALIBRAÇÃO, ENTRE OUTROS:**

Não se aplica.

**XII - QUANDO APLICÁVEL, RECOMENDAÇÕES PARA PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE:**

Não se aplica.

**XIII - PROCEDIMENTO DE ENSAIO, INCLUINDO CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS:**  
CHECAGENS PRÉ-USO

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

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS BRANCAS PEROXIDASE POSITIVAS

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

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

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

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

---

### 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 =  $0.6 \times 2 \text{ mill/mL} = 1.2 \text{ mill/mL}$

### 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 antracito, vista nas células positivas.

### **XIV - INFORMAÇÃO SOBRE SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES QUE PODEM AFETAR O DESEMPENHO DO ENSAIO:**

Não se aplica.

### **XV - CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO, TAIS COMO SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, EXATIDÃO E PRECISÃO, EXCETO PARA INSTRUMENTOS:**

#### SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Em estudo de validação independente, 44 amostras (contendo > 1 mill/ml de células redondas) foram analisadas por operadores diferentes com o LeucoScreen e LeucoScreen Plus. Peculiaridades de performance:

Acurácia: Ambos os kits forneceram resultados comparáveis, baseado na análise Passing Bablok.

Precisão: Ambos os kits podem distinguir entre células redondas peroxidase positivas e negativas com precisão comparável (LeucoScreen Plus: CVintra: 12%; Cvinter: 10%)

### **XVI - RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS:**

#### 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.

### **XVII - INTERVALOS DE REFERÊNCIA, QUANDO APLICÁVEL:**

Não se aplica.

---

**XVIII - QUANDO RELEVANTE, REQUISITOS DE INSTALAÇÕES ESPECIAIS (COMO SALA LIMPA) OU TREINAMENTO ESPECIAL (COMO EM SEGURANÇA CONTRA RADIAÇÃO) OU QUALIFICAÇÕES ESPECÍFICAS DO USUÁRIO DO PRODUTO;**

Não se aplica.

**XIX - SE O PRODUTO É FORNECIDO ESTÉRIL, INSTRUÇÕES DE COMO AGIR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA ANTES DO USO:**

Não se aplica.

**XX - INFORMAÇÃO DE OUTROS PRODUTOS, MATERIAIS OU INSTRUMENTOS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO ENSAIO OU REAÇÃO:**

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

**XXI - ALERTAS OU PRECAUÇÕES A SEREM TOMADAS COM RELAÇÃO AO DESCARTE DO PRODUTO, DE SEUS ACESSÓRIOS E DOS CONSUMÍVEIS USADOS, INCLUINDO RISCOS DE INFECÇÃO OU MICROBIOLÓGICOS, AMBIENTAIS E FÍSICOS:**

É recomendado o uso de luvas. O Reagente 1 contém metanol: evitar a inalação de vapores. O Reagente 2 contém H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 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

**XXII - PARA PRODUTOS DESTINADOS A USUÁRIOS LEIGOS, AS CIRCUNSTÂNCIAS NAS QUAIS O USUÁRIO DEVE CONSULTAR UM PROFISSIONAL DE SAÚDE:**

Não se aplica.

**XXIII - DATA DE EMISSÃO OU ÚLTIMA REVISÃO DAS INSTRUÇÕES DE USO E, QUANDO APROPRIADO, UMA IDENTIFICAÇÃO NUMÉRICA:**

Referencia do Fornecedor: FP09 I111 R01 A.2 - Atualização: 03/09/2018.

Revisão Intermedical: Ver 01: 14/02/2019.

**XXIV - INDICAÇÃO DOS TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO:**

Cada lote do produto é testado e os resultados são fornecidos relativos a um Certificado de Análise específico para o lote, disponível sob pedido.

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

---



**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. Johanisson 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.

---

**RESPONSÁVEL TÉCNICO**

Ronaldo Reis Fontoura  
CRM 5251022-5

---

**REPRESENTANTE LEGAL**

Ronaldo Reis Fontoura

---