

LeucoScreen



Réf. doc. : FP09 I05 R01 B.13, Mise à jour : 5/09/2018

Kit histochimique semi-quantitatif pour la détermination de leucocytes

positifs à la peroxydase dans le sperme humain

Usage diagnostic *in vitro* (DIV) - Réactif réservé à un usage professionnel.

INTRODUCTION

La plupart des éjaculats humains contiennent des leucocytes, dont la forme prédominante sont des granulocytes positifs à la peroxydase^{1,2,3,4}. Une présence excessive de ces cellules (leucocytospermie) peut indiquer une infection de l'appareil reproducteur. La leucocytospermie peut aussi être associée à d'autres anomalies du sperme comme une diminution du volume de l'éjaculat, une oligospermie, une asthénospermie, pouvant aller jusqu'à une dégradation de la fonction spermatique due à un stress oxydatif^{2,5} et/ou à la sécrétion de cytokines cytotoxiques⁶.

Bien que la leucocytospermie ne soit pas une indication absolue d'infertilité, cette affection est observée en moyenne chez 10 à 20% de tous les hommes infertiles⁸.

Lorsqu'une analyse cytologique du sperme est effectuée, il est très difficile de différencier les globules blancs d'autres types de cellules rondes (par exemple certaines de la lignée germinale⁷). Il est alors nécessaire d'utiliser une technique de coloration spécifique des leucocytes, rapide et peu coûteuse en utilisant leur pouvoir peroxydasique⁷. Le kit LeucoScreen est basé sur cette technique et peut donc être utilisé pour colorer les globules blancs positifs à la peroxydase dans un échantillon de sperme humain.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, la présence de plus d'un million de globules blancs positifs à la peroxydase (WBC) par ml d'éjaculat est considérée comme anormale et est étiquetée comme "leucocytospermie"⁴. Cependant, ce seuil fait l'objet d'un débat, certains ayant trouvé cette valeur trop faible et d'autres trop élevées. En effet, des seuils de $0,2 \times 10^6$ - 2×10^6 ont été rapportés dans la littérature⁸⁻¹⁰.

Lorsque le seuil d'un million de globules blancs positifs à la peroxydase par ml d'éjaculat est dépassé, des tests microbiologiques doivent être effectués pour déterminer s'il y a une infection des glandes annexes. L'évaluation des marqueurs des glandes annexes peut fournir des informations supplémentaires utiles sur le bon fonctionnement de l'épididyme (EpiScreen Plus, FertiPro NV), des vésicules séminales (Fructose Test, FertiPro NV) ou de la prostate (Citric Acid Test, FertiPro NV). Fait important, l'absence de leucocytes n'exclut pas toujours la possibilité d'une infection des glandes annexes.

Le nombre de tests pouvant être effectués avec le kit LeucoScreen n'est pas spécifié, en revanche le kit a été conçu pour 20 jours d'analyse.

MATÉRIEL FOURNI AVEC LE TEST

- Réactif 1 – 20 ml de colorant LeucoScreen (contient : benzidine, cyanosine et méthanol).
- Réactif 2 – 1 ml de peroxyde d'hydrogène à 3 %.

Un certificat d'analyse et la FDS peuvent être téléchargés depuis notre site internet (www.fertipro.com).

MATÉRIEL NON FOURNI AVEC LE TEST

Lames porte-objet, lamelles couvre-objet, pipettes, microscope.

PRINCIPE DU TEST

Les granules des leucocytes polymorphonucléaires contiennent de la peroxydase. La peroxydase catalyse le peroxyde d'hydrogène dans l'eau et des ions d'oxygène libres, qui à leur tour, oxydent la benzidine, qui prend une couleur marron et donne une couleur marron aux cellules positives à la peroxydase. Le réactif 1 contient également un liquide de contraste rouge permettant de distinguer les cellules rondes positives à la peroxydase et les cellules rondes négatives à la peroxydase.

INTERPRÉTATION

- Cellules rondes **positives à la peroxydase** prennent une couleur jaune à marron/marron-rouge. Ce sont des globules blancs polymorphonucléaires.
Note : Les cellules positives sont complètement ou partiellement marrons, parfois seulement visibles comme des taches marrons.
- Cellules rondes **négative à la peroxydase** sont coloré en rose. Ce sont des autres cellules rondes (par exemple spermatozoïdes, globules blancs peroxydase-négative).

TYPE D'ÉCHANTILLON

Sperme native liquéfié avec plus que 1×10^6 cellules rondes par ml.

METHODE¹¹

1. Comptez les cellules rondes en calculant la concentration de spermatozoïdes dans une analyse de routine. Calculez et notez la concentration total de cellules rondes en millions/ml, car cette concentration est nécessaire pour le calcul de la concentration de globules blanc positifs à la peroxydase. Quand la concentration de cellules rondes dépasse 1×10^6 par ml, le test LeucoScreen est indiqué.
2. Préparez la solution de travail sous une hotte aspirante (réactif 1 est toxique): Ajoutez 30 µl de réactif 2 à 1 ml de réactif 1 et mélangez à fond. Cette solution de travail reste stable pendant une journée.
3. Mélangez une goutte (10 µl) de sperme avec une goutte (10 µl) de solution de travail au moyen du bord de la lamelle couvre-objet. Mélangez soigneusement durant au moins une minute.

4. Attendez 1 minute. Couvrez avec la lamelle couvre-objet en évitant de piéger des bulles d'air. L'apparition de petites bulles d'air est normale; elle est due à la réaction catalysée par la peroxydase. Plus la concentration en cellules positives à la peroxydase sera élevée, plus le nombre de bulles formées sera important. **Remarque :** en cas de formation excessive de bulles, examinez immédiatement la lame.

5. Après 2 minutes, lisez au moins 20 champs de microscope différents et comptez les cellules rondes «peroxydase-positives» et «peroxydase-négative» (voyez chapitre INTERPRÉTATION). Utilisez un grossissement de 400 x.

Nous recommandons de regarder notre vidéo de démonstration (télécharger le lien sur notre site internet www.fertipro.com, ou scanner le code-barres) :



CALCUL DE LA CONCENTRATION DES LEUCOCYTES POSITIFS A LA PEROXYDASE

- Calculez la proportion de cellules positives à la peroxydase comme suit :

$$\text{PROPORTION DE CELLULES RONDLES POSITIVES} = \frac{\text{Nombre de cellules rondes POSITIVES}}{\text{(Nombre de cellules rondes POSITIVES + Nombre de cellules rondes NÉGATIVES)}}$$

- Calculez ensuite la concentration de leucocytes positifs à la peroxydase dans l'échantillon de sperme comme suit :

$$\text{CONCENTRATION (millions/ml)} = \text{Proportion de cellules rondes positives} \times \text{concentration totale de cellules rondes}$$

Exemple :

- La concentration totale de cellules rondes est de 2 millions/ml (déterminée lors de l'analyse de la concentration des spermatozoïdes)
- Le test LeucoScreen indique que 120 cellules rondes sont positives et 80 négatives
- Proportion de cellules rondes positives = $\frac{120}{(120 + 80)} = 0,6$
- Concentration de leucocytes positifs à la peroxydase = $0,6 \times 2 \text{ millions/ml} = 1,2 \text{ million/ml}$

CONSERVATION

Conservez les réactifs entre 2°C-25°C. Le produit reste stable après transport ou stockage à court terme aux températures élevées (jusqu'à 5 jours à $\leq 37^\circ\text{C}$). Ne pas congeler. Le kit est stable pendant au moins de 12 mois après la date de production (même si les bouteilles ont été ouvertes), ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur l'étiquette du produit. La solution de travail peut être conservée jusqu'à 24 heures à température ambiante, protégée de la lumière (du soleil).

REMARQUES

La formation d'un sédiment dans le réactif 1 est normale. Versez simplement le réactif 1 sur du papier-filtre pour éliminer le sédiment.

Si la concentration totale de cellules rondes n'a pas été déterminée sur l'échantillon (suppression de l'étape 1 de la section consacrée à la méthode, ce qui est déconseillé !), il est possible de calculer la concentration de leucocytes positifs à la peroxydase d'après le nombre de ces cellules présentes dans un champ microscopique. À cette fin, il est important de tenir compte du volume exact du mélange à base de sperme examiné dans un champ microscopique. Ce volume, exprimé en µl, est calculé comme suit :

- Mesurer le diamètre d'un champ microscopique à l'aide d'un micromètre, puis calculer le rayon :
 $r = \text{rayon (mm)} = \frac{\text{diamètre (}\mu\text{m)}}{2} / 1000$

- Calculer la profondeur de l'échantillon (= distance entre lamelles) :
 $P = \text{profondeur (mm)} =$

$$\frac{\text{Volume mélange à base de sperme (20 }\mu\text{l)}}{\text{Longueur (mm)} \times \text{largeur (mm) de la lamelle couvre-objet}}$$

- $V = \text{volume dans un champ microscopique (}\mu\text{l)} = \text{profondeur} \times \text{rayon}^2 \times 3,14$

Examinez au moins 20 champs microscopiques différents et comptez le nombre de cellules rondes positives à la peroxydase. Procéder au calcul suivant :

- M = nombre moyen de cellules positives par champ microscopique
- N = nombre de cellules positives par mélange à base de sperme

$$(\text{cellules/ml}) = \frac{M}{V} \times 10^3$$

- Concentration de leucocytes positifs à la peroxydase dans l'échantillon de sperme d'origine (cellules/ml) : $2 \times N$

Exemple :

- Diamètre d'un champ microscopique = 250 µm → $r = 0,125 \text{ mm}$
- Lamelle couvre-objet = 24 x 40 mm → $P = [20 / (24 \times 40)] = 0,0208 \text{ mm}$
- $V = 0,0208 \times 0,125^2 \times 3,14 = 0,00102 \mu\text{l}$
- 100 leucocytes positifs à la peroxydase comptés dans 20 champs → $M = 5$
- $N = 5 / 0,00102 \times 10^3 = 4.900.000 \text{ cellules/ml}$
- Concentration de leucocytes positifs à la peroxydase dans l'échantillon de sperme d'origine (cellules/ml) = $2 \times 4.900.000 = 9.800.000 \text{ cellules/ml}$.

LIMITES DE LA MÉTHODE

Ce test est une aide au diagnostic de l'infertilité masculine et, comme pour les autres tests biologiques, les résultats doivent être interprétés à la lumière des observations cliniques et des données de l'anamnèse. Le test LeucoScreen ne colore que les globules blancs positifs à la peroxydase; les autres types de globules blancs (lymphocytes et monocytes, p. ex.) ne peuvent pas être détectés.

PERFORMANCE

La sensibilité et la spécificité de la leucocytospermie est de 90% par rapport au test immunohistologique¹², le seuil est de 1 million de GB/ml pour la coloration par la peroxydase et de 2 millions de GB/ml pour le test immunohistologique. Le test LeucoScreen peut distinguer les cellules rondes positives et négatives à la peroxydase avec précision (CV_{intra} et $CV_{inter} < 10\%$).

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Tous les échantillons de sperme doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Manipulez tous les échantillons dans les conditions prévues pour les agents susceptibles de transmettre le VIH ou l'hépatite.

Le réactif 1 est très toxique par inhalation, contact cutané ou ingestion. Risque de lésions irréversibles. Retirez immédiatement les vêtements contaminés. Portez des vêtements de protection. Travaillez sous une hotte aspirante. En cas d'accident, quel qu'il soit, consultez un médecin. Le réactif 2 est corrosif, provoque des brûlures. Après tout contact avec la peau, lavez immédiatement avec de l'eau et du savon. Portez une protection oculaire/des protections visage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-36.
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*, 13:433-51.
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*, 5:639-44.
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*, 41:183-7.
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*, 47:460-5.
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.
11. Endtz, A.W. (1972) Een methode om het vochtige urinesediment en het vochtige menselijke sperma rechtstreeks te kleuren. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 116(17): 681-5.
12. Politch, J.A., et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60(2): 372-5.

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

