

LeucoScreen

Réf. doc. : FP09 I05 R01 B.9, Mise à jour : 12/04/2016



INTRODUCTION

La plupart des éjaculats humains contiennent des leucocytes (Wolff et Anderson, 1988 ; Aitken et West, 1990 ; Barratt et al, 1990), le type cellulaire prédominant étant les neutrophiles. Une présence excessive de ces cellules (leucocytospermie) peut indiquer une infection de l'appareil reproducteur.

La leucocytospermie peut en outre 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 (Aitken et al, 1989 ; Aitken et West, 1990) et/ou à la sécrétion de cytokines cytotoxiques (Hill et al, 1987).

Il est difficile de définir une concentration seuil en leucocytes au-delà de laquelle la fertilité sera compromise. L'impact de ces cellules dépend du site d'entrée des leucocytes dans le sperme, du type de leucocytes concerné et de leur état d'activation.

Comme règle générale, un éjaculat normal ne devrait pas contenir plus de 5×10^6 cellules rondes/ml, le nombre de leucocytes ne pouvant quant à lui pas dépasser 1×10^6 /ml (OMS, 1992). Lorsque le sperme contient plus de 1×10^6 globules blancs/ml, des tests microbiologiques doivent être réalisés pour identifier toute infection éventuelle des glandes annexes.

Remarque : l'absence de leucocytes n'exclut pas la possibilité d'une infection des glandes annexes.

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 FS sont disponibles sur notre site internet (www.fertipro.com).

MATÉRIEL NON FOURNI AVEC LE TEST

- Lames porte-objet.
- Lamelles couvre-objet.
- Pipettes.

PRINCIPE DU TEST

Les granules des leucocytes polynucléaires neutrophiles contiennent de la peroxydase qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, forme de l'eau et des ions oxygènes libres ; ces derniers oxydent alors la benzidine, qui prend une couleur marron et donne une couleur marron aux cellules. 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.

METHODE (ENDTZ, 1972)

1. Préparation de la solution de travail :
Ajouter 30 µl de réactif 2 à 1 ml de réactif 1. Cette solution de travail reste stable pendant une journée.
2. Mélanger une goutte (10 µl) de sperme avec une goutte (10 µl) de solution de travail au moyen du bord de la lamelle couvre-objet. Mélanger soigneusement durant au moins une minute.
3. Couvrir avec la lamelle couvre-objet deux minutes environ après le mélange initial, 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, examiner immédiatement la lame.
4. Lire le résultat après 2 minutes à un grossissement de 400 x (examiner au moins 20 champs de microscopes différents).

CALCUL DE LA CONCENTRATION EN GLOBULES BLANCS

CONCENTRATION EN SPERMATOZOÏDES CONNUE

Compter le nombre de GB et le nombre de spermatozoïdes. Calculer la concentration de GB à l'aide de la formule suivante :

(Nombre de GB/Nombre de spermatozoïdes) x Concentration en spermatozoïdes (millions/ml)

Cette méthode ne fonctionne que si l'échantillon de sperme contient des spermatozoïdes (de préférence plus de 10 millions/ml).

CONCENTRATION EN SPERMATOZOÏDES INCONNUE

Dans ce cas, la concentration en GB peut être déterminée en multipliant le nombre de GB par un facteur connu basé sur la taille d'un champ de microscope et sur la hauteur entre la lame porte-objet et la lamelle couvre-objet (soit la profondeur de l'échantillon de sperme).

Le diamètre du champ de microscope peut être mesuré à l'aide d'un micromètre. La surface d'un champ est égale au carré de son rayon multiplié par pi ($S = \pi r^2$).

Exemple : diamètre = 250 µm → rayon = 125 µm → surface = 49 086 µm²

La distance entre la lame porte-objet et la lamelle couvre-objet peut être calculée avec la formule suivante :

Hauteur (en µm) = volume (en µl)/(longueur x largeur de la lamelle couvre-objet en mm). Exemple : volume de l'échantillon = 20 µl, lamelle couvre-objet = 24 x 40 mm

Hauteur = 20/(24 x 40) = 0,0208 mm ou 20,8 µm

Lorsque l'on connaît ces chiffres, un facteur peut être calculé avec la formule suivante :

Facteur = 1 000 000/(surface x hauteur)

Exemple : facteur = 1 000 000 µm³/(49 086 µm² x 20,8 µm) = 0,98

Ceci signifie que si 5 GB sont comptés dans un champ de microscope, la concentration correspondante est de 4,9 millions/ml.

INTERPRÉTATION

- Les cellules prenant une couleur jaune à marron sont positives à la peroxydase : leucocytes polynucléaires neutrophiles.
- Cellules colorées en rose : toutes les autres cellules.

CONSERVATION

Le produit est stable après transport (maximum 5 jours) à température élevée ($\leq 37^\circ\text{C}$). Conserver les réactifs à 2°C - 25°C .

REMARQUES

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

LIMITES DE LA MÉTHODE

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 être détectés.

SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ

Dans une étude comparative, Politch et al (Politch, 1993) concluent que la sensibilité et la spécificité de la coloration par la peroxydase pour la leucocytospermie est de 90 % par comparaison avec le test immunohistologique.

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.

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

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

Le réactif 1 contient de la benzidine, de la cyanosine et du méthanol. Très toxique par inhalation, contact cutané ou ingestion. Risque de lésions irréversibles. Retirer immédiatement les vêtements contaminés. Porter des vêtements de protection. En cas d'accident, quel qu'il soit, consulter un médecin. Le réactif 2 contient de l'H₂O₂ : corrosif, provoque des brûlures. Après tout contact avec la peau, laver immédiatement avec de l'eau et du savon. Porter une protection oculaire/du visage.

BIBLIOGRAPHIE

Aitken, R.J., West, K.M. 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*, 1990, vol. 13, p. 433-451.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 1989, vol. 41, p. 183-187.

Barratt, C.L.R., Bolton, A.E., Cooke, I.D. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 1990, vol. 5, p. 639-644.

Endtz, A.W. Een methode om het vochtige urinesediment en het vochtige menselijke sperma rechtstreeks te kleuren. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 1972, vol. 116 (n° 17), p. 681-685.

Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A., Anderson, D.J. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 1987, vol. 47, p. 460-465.

Politch, J.A., et al. Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 1993, vol. 60 (n° 2), p. 372-375.

OMS. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, troisième édition, Cambridge University Press, Cambridge, 1992, p. 107.

Wolff, H., Anderson, D.J. Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 1988, vol. 53, p. 528-536.



FertiPro N.V. - Industriepark Noord 32

8730 Beernem, Belgique

URL : <http://www.fertipro.com>

E-mail : info@fertipro.com

ID dispositif : LEUCO

