

LeucoScreen Plus



Ημιποσοτικό ιστοχημικό kit για τον προσδιορισμό των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων σε ανθρώπινο σπέρμα
Έγγραφο αναφοράς: FP09 I111 R01 A.4 Ενημέρωση: 1/02/2021
Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro - Αντιδραστήριο μόνο για επαγγελματική χρήση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πλειοψηφία του ανθρώπινου σπέρματος περιέχει λευκοκύτταρα και η κύρια μορφή λευκοκυττάρων στο ανθρώπινο σπέρμα είναι τα θετικά στην υπεροξειδάση κοκκιοκύτταρα^{1,2,3,4}. Η υπερβολική παρουσία των κυττάρων αυτών (λευκοκυτταροσπερμία) μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία λοίμωξης του αναπαραγωγικού συστήματος. Η λευκοκυτταροσπερμία μπορεί επίσης να συσχετίζεται με ελαττώματα στο σπερματικό προφίλ (μείωση της κινητικότητας του σπέρματος και της ακεραιότητας του DNA, αύξηση του ιξώδους του σπέρματος καθώς και μειωμένη λειτουργία του σπέρματος ως αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες, ή/και έκκριση κυταροτοξικών κυταροκινών από αυτά τα λευκά αιμοσφαίρια). Παρόλο που η λευκοκυτταροσπερμία δεν αποτελεί απόλυτη ένδειξη υπογονιμότητας, η πάθηση αυτή παρατηρείται κατά μέσο όρο στο 10 με 20% των υπογόνιμων ανδρών⁸.

Όταν εκτελείται μια τυπική ανάλυση σπέρματος, είναι πολύ δύσκολη η διάκριση μεταξύ λευκών αιμοσφαιρίων και άλλων ειδών στρογγυλών κυττάρων στο δείγμα σπέρματος (για παράδειγμα πρόδρομων σπερματογόνων κυττάρων⁷). Μια σχετικά ταχεία και οικονομική μέθοδος για τη διάκριση μεταξύ των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων και άλλων στρογγυλών κυττάρων σε ένα δείγμα σπέρματος χρησιμοποιεί την εγγενή δραστηριότητα της υπεροξειδάσης στα κύτταρα αυτά⁷. Το LeucoScreen Plus βασίζεται, όπως και το LeucoScreen, στην τεχνική αυτή και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χρώση των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων σε δείγματα ανθρώπινου σπέρματος.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η παρουσία περισσότερων από ενός εκατομμυρίου θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ανά ml σπερματικού υγρού θεωρείται μη φυσιολογική και επισημαίνεται ως «λευκοκυτταροσπερμία»⁴. Ωστόσο, το κατώτερο όριο αυτό είναι υπό συζήτηση, καθώς ορισμένοι έχουν υποστηρίξει ότι η τιμή αυτή είναι πολύ χαμηλή και άλλοι ότι είναι πολύ υψηλή. Πράγματι, έχουν αναφερθεί και οριακά επίπεδα από $0,2 \times 10^6$ – 2×10^6 ⁸⁻¹⁰.

Όταν υπερβαίνεται το όριο του ενός εκατομμυρίου θετικών στην υπεροξειδάση WBC ανά ml σπερματικού υγρού, θα πρέπει να εκτελούνται μικροβιολογικές εξετάσεις για τη διερεύνηση ύπαρξης λοίμωξης σε κάποιον βοηθητικό αδέν. Η αξιολόγηση δεικτών για τους βοηθητικούς αδένες μπορεί να προσφέρει πρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες για τη σωστή λειτουργία της επιδιδυμίδας, (EpiScreen Plus, FertiPro nv), των σπερματοδόχων κύστεων (Fructose Test, FertiPro nv) ή του προστάτη. Σημαντικό σημείο είναι ότι η απουσία λευκοκυττάρων δεν αποκλείει την πιθανότητα λοίμωξης σε βοηθητικούς αδένες.

Ο αριθμός των εξετάσεων που μπορούν να διενεργηθούν με το kit LeucoScreen δεν προσδιορίζεται. Αντ' αυτού, το kit είναι σχεδιασμένο για 40 ημέρες αναλύσεων κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του kit (δυνατότητα παρασκευής 20 διαλυμάτων εργασίας, τα οποία παραμένουν σταθερά για 2 συνεχόμενες ημέρες).

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ

- Αντιδραστήριο 1 – 6 ml διαλύματος υποστρώματος (4-CN σε μεθανόλη)
- Αντιδραστήριο 2 – 300 ml 30% υπεροξειδίου υδρογόνου
- Αντιδραστήριο 3 – 22 ml ρυθμιστικού διαλύματος
- Αντιδραστήριο 4 – 1,2 ml of διαλύματος αντιχρώσης

Το πιστοποιητικό ανάλυσης και το ΔΔΑΥ είναι διαθέσιμα από τον ιστότοπό μας (www.fertipro.com).

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ

Πλακίδια μικροσκοπίου, καλυπτρίδες, σωληνάρια (erpendorf), πιπέτες, μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

Σημείωση: Συνιστάται η χρήση φωτονικού μικροσκοπίου, αλλά όχι μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων καθώς αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε ερμηνευτικές δυσχέρειες.

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η εξέταση αυτή θα πρέπει να διενεργείται σε φρέσκα δείγματα ανθρώπινου σπέρματος που περιέχουν περισσότερα από 1×10^6 στρογγυλά κύτταρα ανά ml. Η εξέταση θα πρέπει να διενεργείται εντός της ίδιας ημέρας από τη συλλογή του σπέρματος.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η μυελοϋπεροξειδάση, η οποία βρίσκεται στα κοκκία ορισμένων λευκοκυττάρων, οξειδώνει την 4-CN προς μια κυανωπό προς ιώδες ίζημα 4-χλωρο-1-ναφθόνης, χρησιμοποιώντας H_2O_2 ως οξειδωτικό μέσο. Το Reagent 4 περιέχει διάλυμα αντιχρώσης για τη διευκόλυνση της διάκρισης μεταξύ των θετικών στην υπεροξειδάση στρογγυλών κυττάρων και των αρνητικών στην υπεροξειδάση στρογγυλών κυττάρων.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- **Θετικά στην υπεροξειδάση στρογγυλά κύτταρα:** περιέχουν (κυανωπό)-μαύρα κοκκία και έχουν ανθρακί-γκρι κυταρόπλασμα. Η ανθρακί περιοχή αυτή μπορεί να καλύπτει ολόκληρο το κύτταρο ή μέρος του.
- **Αρνητικά στην υπεροξειδάση στρογγυλά κύτταρα:** αρνητικά στη χρώση ή χρώματος ροζ. Τα κοκκία που παρατηρούνται στα αρνητικά στη χρώση κύτταρα δεν περιβάλλονται από το τυπικό ανθρακί χρώμα που παρατηρείται στα θετικά κύτταρα.

ΑΠΟΔΟΣΗ

Σε μια ανεξάρτητη μελέτη επικύρωσης, 44 δείγματα αναλύθηκαν από διαφορετικούς χειριστές με τα LeucoScreen και LeucoScreen Plus. Χαρακτηριστικά απόδοσης:

- **Ακρίβεια:** Και τα δύο kit έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα βάσει ανάλυσης Passing Bablok.
- **Ακρίβεια:** Και τα δύο kit μπορούν να διαχωρίσουν τα θετικά στην υπεροξειδάση στρογγυλά κύτταρα από τα αρνητικά με συγκρίσιμη ακρίβεια (LeucoScreen Plus: CV_{εντός}: 12%, CV_{μεταξύ}: 10%)

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ

Το Reagent 1 θα πρέπει να περιέχει ένα διαυγές υγρό, μη χρησιμοποιήσετε το kit εάν το υγρό αποκτήσει κίτρινη όψη.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Πριν από την πρώτη χρήση του kit LeucoScreen Plus, συνιστούμε ιδιαίτερα να ακολουθήσετε το πρόγραμμα εκπαίδευσης και να παρακολουθήσετε το βίντεο επίδειξης. Και τα δύο είναι διαθέσιμα στον ιστότοπό μας. Το βίντεο μπορεί επίσης να μεταφορτωθεί σαρώνοντας τον ακόλουθο κωδικό QR:



- Μετρήστε τον αριθμό στρογγυλών κυττάρων. Παράλληλα προσδιορίστε τη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης σπέρματος ρουτίνας. Υπολογίστε και σημειώστε τη συνολική συγκέντρωση στρογγυλών κυττάρων σε εκ./ml, καθώς αυτή θα χρειαστεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων. Όταν η συγκέντρωση των στρογγυλών κυττάρων υπερβαίνει τα 1×10^6 ανά ml, ενδείκνυται η εξέταση LeucoScreen Plus.
- Προετοιμάστε το διάλυμα εργασίας: Προσθέστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο Erpendorf και αναμείξτε καλά.
 - 200 μl Αντιδραστήριου 1
 - 5 μl Αντιδραστήριου 2
 - 1 ml Αντιδραστήριου 3.Το διάλυμα εργασίας αυτό είναι σταθερό για 48 ώρες όταν φυλάσσεται μεταξύ 2-8°C, προστατευμένο από το (ηλιακό) φως.
- Πάρτε 10 μl από το δείγμα σπέρματος και προσθέστε 20 μl από το διάλυμα εργασίας. Αναμείξτε καλά.
- Επιβάστε για δύο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου **στο σκοτάδι**.
- Μεταφέρετε 10 μl από το μείγμα στο κέντρο ενός πλακιδίου μικροσκοπίας και προσθέστε 10 μl Reagent 4. Αναμείξτε καλά χρησιμοποιώντας την άκρη της καλυπτρίδας.
- Καλύψτε με την καλυπτρίδα
- Μετρήστε και κατηγοριοποιήστε συνολικά 200 στρογγυλά κύτταρα χρησιμοποιώντας μεγέθυνση 400x. Παρατηρήστε διαφορετικά πεδία στο μικροσκόπιο (κατά προτίμηση 20).

Σημείωση: Σε ορισμένα δείγματα σπέρματος, μπορεί να προτιμηθεί να εμπλουτίσετε τη συγκέντρωση των στρογγυλών κυττάρων για τη διευκόλυνση της μέτρησης των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, φυοκεντρήστε το δείγμα για 15 λεπτά στα 350g, αφαιρέστε ποσότητα από το δείγμα και επαναιωρήστε το ίζημα.

Σε περίπτωση πολύ υψηλής συγκέντρωσης στρογγυλών κυττάρων (δηλαδή, πάνω από 20×10^6 per ml), συνιστάται η αραιώση του δείγματος σε PBS ή σε μέσο FertiCult™ Flushing.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΛΕΥΚΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ

- Υπολογίστε το ποσοστό θετικών στην υπεροξειδάση κυττάρων ως εξής:

$$\text{ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΣΤΡΟΓΓΥΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ} = \frac{\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΕΤΙΚΩΝ στρογγυλών κυττάρων}}{(\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΕΤΙΚΩΝ στρογγυλών κυττάρων} + \text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ στρογγυλών κυττάρων})}$$

- Στη συνέχεια, υπολογίστε τη συγκέντρωση των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων στο δείγμα σπέρματος ως εξής:

$$\text{ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (εκ./mL)} = \text{Ποσοστό θετικών στρογγυλών κυττάρων} \times \text{συνολική συγκέντρωση στρογγυλών κυττάρων}$$

Παράδειγμα:

- Η συνολική συγκέντρωση στρογγυλών κυττάρων είναι 2 εκ./mL (προσδιορισμένη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης της συγκέντρωσης του σπέρματος)
- Με την εξέταση LeucoScreen Plus, ευρέθηκαν 120 στρογγυλά θετικά κύτταρα και 80 αρνητικά στρογγυλά κύτταρα
- Ποσοστό θετικών στρογγυλών κυττάρων = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$
- Υπολογισμός θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων = $0,6 \times 2 \text{ εκ./mL} = 1,2 \text{ εκ./mL}$

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια μεταξύ 2°C-25°C. Κατάλληλο για μεταφορά ή βραχυπρόθεσμη φύλαξη σε υψηλές θερμοκρασίες (έως και 5 ημέρες στους 37°C). Να μην καταψύχονται. Να προστατεύονται από το (ηλιακό) φως. Το kit είναι σταθερό για τουλάχιστον 12 μήνες μετά από την ημερομηνία παραγωγής (ακόμα και μετά από το άνοιγμα). Να μη χρησιμοποιείται μετά από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στην ετικέτα προϊόντος. Τα φιαλίδια πρέπει να διατηρούνται πάντα ερμητικά κλειστά. Το διάλυμα εργασίας μπορεί να φυλαχτεί έως και 48 ώρες στους 2-8°C, προστατευμένο από το (ηλιακό) φως.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση αυτή αποτελεί βοηθητικό μέσο για τη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας, όπως και άλλες βιολογικές εξετάσεις. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο των κλινικών ευρημάτων και δεδομένων του ιστορικού. Η εξέταση LeucoScreen Plus λειτουργεί μόνο ως χρώση των θετικών στην υπεροξειδάση WBC, άλλοι τύποι WBC (π.χ. λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) δεν ανιχνεύονται.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Συνιστάται η χρήση γαντιών. Το Reagent 1 περιέχει μεθανόλη: αποφύγετε την εισπνοή ατμών. Το Reagent 2 περιέχει H₂O₂: διαβρωτικό, προκαλεί εγκαύματα. Μετά από επαφή με το δέρμα πλύνετε άμεσα με νερό και σαπούνι. Να χρησιμοποιείτε συσκευή προστασίας ματιών/προσώπου. Όλα τα δείγματα σπέρματος θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμώδη. Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα σαν να είναι κανά να μεταδώσουν HIV ή ηπατίτιδα. Να χρησιμοποιείτε πάντα καινούργια ρύγχη πιπετών για κάθε βήμα προς αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Να μην απορρίπτετε το προϊόν στο περιβάλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. 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.

 FertiPro nv, Industriepark Noord 32,
8730 Beernem, Βέλγιο.
URL: <https://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com



LEUCO_PLUS