



LeucoScreen Plus

Set histochimic semi-cantitativ pentru determinarea leucocitelor peroxidaz-pozitive în materialul seminal uman

IVD

ID document: FP09 I111 R01 B.2
Actualizare: 14/05/2024

MATERIAL INCLUS

Număr de catalog

LeucoScreen Plus

LEUCO_PLUS	LeucoScreen Plus – 40 days of analysis
------------	--

ASISTENȚĂ TEHNICĂ PENTRU CLIEȚI

FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem / Belgium
Tel +32 (0)50 79 18 05
Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: www.fertipro.com
E-mail: info@fertipro.com



LeucoScreen Plus

Exclusiv pentru diagnosticare in vitro.
Reactiv exclusiv pentru uz profesional.

INFORMAȚII GENERALE

În majoritatea cazurilor, lichidul seminal ejaculat uman conține leucocite, iar forma predominantă de leucocite în materialul seminal uman sunt granulocitele peroxidaz-pozitive⁽¹⁻⁴⁾. Prezența excesivă a acestor celule (leucocitospermie) poate indica existența unei infecții a tractului reproducător. Leucocitospermia poate fi, de asemenea, asociată cu defecte ale profilului materialului seminal (reducerea motilității spermatozoidilor și a integrității ADN-ului, creșterea vâscozității spermei, precum și pierderea funcției spermatozoidilor ca urmare a stresului oxidativ și/sau secreția de citokine citotoxice de către aceste leucocite)^(5, 6). Deși leucocitospermia nu este o indicație absolută a infertilității, această afecțiune este observată în medie la 10 până la 20% din toți bărbații infertil⁽⁷⁾.

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății (WHO), prezența a peste un milion de leucocite peroxidaz-pozitive (WBC) per ml de lichid seminal ejaculat este considerată anormală și este etichetată ca fiind „leucocitospermie”⁽⁴⁾. Acest prag este însă în curs de dezbateri, deoarece unii au considerat această valoare prea mică, iar alții prea mare. Într-adevăr, au fost raportate praguri de la 0.2 x 10⁶ la 2 x 10⁶ (7-9).

Când pragul de un milion de leucocite peroxidaz-pozitive per ml de lichid seminal ejaculat este depășit, trebuie efectuate teste microbiologice pentru a investiga dacă există o infecție a glandelor accesorii. Evaluarea markerilor glandelor accesorii poate oferi informații utile suplimentare despre buna funcționare a epididimului (EpiScreen Plus, FertiPro NV), a veziculelor seminale (Fructose Test, FertiPro NV) sau a prostatei. Important, absența leucocitelor nu exclude posibilitatea unei infecții a glandelor accesorii.

SCOPUL PREVĂZUT

LeucoScreen Plus este un set histochimic și de diagnosticare semi-cantitativ, non-automatizat pentru determinarea leucocitelor peroxidaz-pozitive în materialul seminal uman.

Numărul de teste care pot fi efectuate cu setul LeucoScreen Plus nu este specificat; în schimb, setul a fost conceput pentru 40 de zile de analiză pe durata de viață a setului (pot fi realizate 20 de soluții de lucru, care sunt stabile timp de 2 zile consecutive).

MATERIALUL INCLUS ÎN TEST

Reactivul 1 – 6 ml soluție de substrat (4-CN în metanol)
Reactivul 2 – 300 µl de peroxid de hidrogen 30%
Reactivul 3 – 22 ml de soluție tampon
Reactivul 4 – 1.2 ml de soluție de colorare de contrast

Un certificat de analiză și MSDS sunt disponibile la cerere sau pot fi descărcate de pe site-ul nostru (www.fertipro.com).

MATERIALE NECESARE, DAR CARE NU SUNT FURNIZATE

Lame pentru microscop, ochelari de acoperire, eprubete de probă (Eppendorf), pipete, microscop cu câmp luminos.

Notă: Se recomandă utilizarea unui microscop cu lumină, nu a unui microscop cu contrast de fază, deoarece acesta din urmă ar putea duce la dificultăți de interpretare.

PRINCIPIUL TESTULUI

Atunci când se efectuează o analiză tipică a materialului seminal, este foarte dificil să se diferențieze leucocitele de alte tipuri de celule rotunde din proba de material seminal (de exemplu, celulele progenitoare spermatogene⁽¹⁰⁾). LeucoScreen Plus utilizează activitatea intrinsecă a peroxidazei anumitor leucocite și, prin urmare, poate fi utilizat pentru a diferenția leucocitele peroxidaz-pozitive [de exemplu granulocite polimorfonucleare (PMN) și macrofage] dintr-o probă de material seminal uman de alte tipuri de celule rotunde.

În prezența Reactivului 2 (H₂O₂), mieloperoxidaza din granulele de leucocite va oxida Reactivul 1 (4-CN) într-un precipitat albastru-violet (4-clor-1-nafton). Reactivul 4 conține o soluție de colorare de contrast pentru a facilita diferențierea celulelor rotunde peroxidaz-pozitive de celulele rotunde peroxidaz-negative.

METODĂ

Înainte de prima utilizare a setului LeucoScreen Plus, vă recomandăm ferm să urmați programul de instruire și să vizualizați videoclipul nostru demonstrativ, ambele disponibile pe site-ul nostru web. Videoclipul poate fi, de asemenea, descărcat scanând acest cod QR:



Tipuri de probe

Testul trebuie efectuat pe probe de material seminal uman proaspăt care conțin mai mult de 1 x 10⁶ celule rotunde pe ml.

Recoltarea probei

Trebuie utilizate recipiente standard de colectare a materialului seminal, de obicei din polipropilenă, și trebuie testată supraviețuirea/motilitatea spermatozoidilor atunci când materialul seminal este colectat prin masturbare. Trebuie să se folosească prezervative din plastic care nu sunt toxice pentru materialul seminal atunci când este descurajată colectarea de material seminal prin masturbare. Păstrați recipientul de colectare a materialului seminal la temperatura camerei înainte de a adăuga proba de material seminal pentru a evita schimbările mari de temperatură care pot afecta spermatozoidii. Testul trebuie efectuat în aceeași zi în care a fost colectat materialul seminal.

Avertizare înainte de utilizare

Nu utilizați produsul dacă sigiliul flacoanelor este deschis sau prezintă defecte la livrarea setului.

Pregătirea reactivilor

Reactivul 1 trebuie să conțină un lichid limpede; nu utilizați setul dacă lichidul a devenit galben.

Methoda

- Numărați celulele rotunde atunci când determinați concentrația spermatozoidilor în timpul analizei de rutină a materialului seminal. Calculați și notați concentrația totală a celulelor rotunde în milioane/ml, deoarece acest lucru va fi necesar pentru calcularea concentrației de leucocite peroxidaz-pozitive. Când concentrația celulelor rotunde depășește 1x10⁶ per ml, este indicat testul LeucoScreen Plus.
- Pregătiți soluția de lucru: Adăugați următoarele volume într-o eprubetă Eppendorf și amestecați bine.
 - 200 µl din reactivul 1
 - 5 µl din reactivul 2
 - 1 ml din reactivul 3Această soluție de lucru este stabilă timp de 48 de ore atunci când este păstrată între 2 și 8 °C, protejată de lumina (soarelui).
- Luați 10 µl din proba de material seminal și adăugați 20 µl de soluție de lucru. Amestecați bine.
- Incubați timp de două minute la temperatura camerei, în întuneric.
- Transferați 10 µl de amestec în mijlocul unui recipient din sticlă de microscop și adăugați 10 µl din reactivul 4. Amestecați bine folosind marginea capacului.
- Acoperiți cu capacul.

7. Numărați și clasificați un total de 200 de celule rotunde folosind o mărire de 400x. Scanați diferite câmpuri microscopice (de preferință 20).
8. După fiecare test individual, eliminați toți reactivii și materialele utilizate.

Notă: În unele probe de material seminal, ați putea prefera să îmbogățiți concentrația de celule rotunde pentru a facilita numărarea celulelor. Prin urmare, centrifugați proba timp de 15 minute la 350 G, scoateți un volum din proba de material seminal și suspendați din nou peleta.

În cazul unei concentrații foarte mari de celule rotunde (adică peste 20×10^6 per ml), se recomandă ferm diluarea probei în PBS sau în FertiCult™ Flushing medium.

INTERPRETARE

- Celule rotunde peroxidaz- pozitive: conțin granule negre (albăstrui) și au o citoplasmă gri-antracit. Această zonă de antracit poate acoperi întreaga celulă sau doar o parte din ea.
- Celulele rotunde peroxidaz-negative: rămân necolorate sau pot fi de culoare roz. Granulele văzute în celulele necolorate nu sunt înconjurate de culoarea tipică de antracit observată la celulele pozitive.

CALCULAREA CONCENTRAȚIEI DE LEUCOCITE PEROXIDAZ-POZITIVE

- Calculați proporția celulelor peroxidaz- pozitive după cum urmează:

$$\text{PROPORȚIE DE CELULE ROTUNDE POZITIVE} = \frac{\text{Numărul de celule rotunde POZITIVE}}{(\text{Numărul de celule rotunde POZITIVE} + \text{Numărul de celule rotunde NEGATIVE})}$$

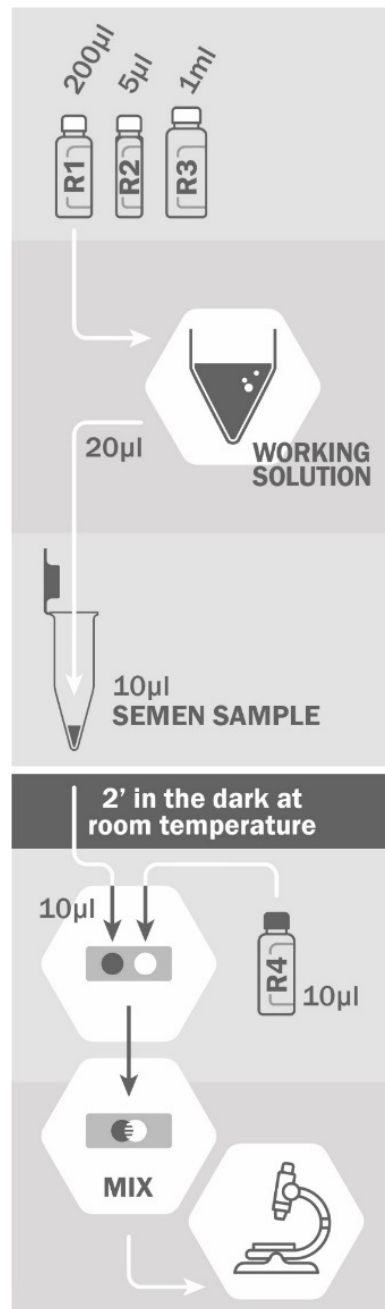
- Acum, calculați concentrația de leucocite peroxidaz- pozitive în proba de material seminal după cum urmează:

$$\text{CONCENTRAȚIE (milioane/ml)} = \text{Proporția celulelor rotunde pozitive} \times \text{concentrația totală a celulelor rotunde}$$

Exemplu:

- Concentrația totală a celulelor rotunde este de 2 milioane/ml (determinată în timpul analizei concentrației spermatozoidelor)
- Cu testul LeucoScreen Plus, 120 de celule rotunde sunt găsite pozitive și 80 de celule rotunde sunt găsite negative
- Proporția celulelor rotunde pozitive = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$
- Concentrația de leucocite peroxidaz- pozitive = $0,6 \times 2$ mili/ml = 1.2 milioane/ml

Prezentarea grafică a protocolului:



LIMITELE METODEI

Acest test ajută la diagnosticarea infertilității masculine și, ca și în cazul altor teste biologice, interpretarea rezultatelor trebuie să se facă în contextul constatărilor clinice și al datelor din anamneză. Testul LeucoScreen Plus colorează doar leucocitele peroxidaz- pozitive; alte tipuri de globule albe (de exemplu, limfocite și monocite) nu sunt detectate.

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

Repetabilitate și reproductibilitate: $CV_{intra} < 15\%$, $CV_{inter} < 15\%$

Procentul de acord pozitiv: 88%, procentul de acord negativ: 96%

DEPOZITARE/ELIMINARE

- Kitul este stabil cel puțin 12 luni de la data producției (chiar și după deschidere).
- A nu se utiliza după data expirării menționată pe eticheta produsului.
- Depozitați reactivii la temperaturi cuprinse între 2°C și 25°C .
- A nu se congela.
- A se păstra departe de lumina (soarelui).
- Sticlele trebuie păstrate bine închise în orice moment.
- Soluția de lucru poate fi stocată până la 48 de ore la $2-8^{\circ}\text{C}$, ferită de lumina (soarelui).
- Reactivii trebuie să fie eliminați în conformitate cu normele locale privind eliminarea dispozitivelor medicale.

PRECAUȚII

Se recomandă utilizarea mănușilor.

Reactivul 1 conține metanol: lichid și vapori foarte inflamabili, toxic în caz de înghițire, în contact cu pielea sau inhalat, cauzează leziuni ale organelor.

Reactivul 2 conține H_2O_2 : dăunător dacă este înghițit sau inhalat; provoacă leziuni grave ale ochilor. Purtați protecție pentru ochi/față.

Reactivul 3 conține ProClin 950: Provoacă arsuri severe ale pielii și leziuni oculare, poate provoca o reacție alergică a pielii.

Toate probele de material seminal trebuie considerate potențial infecțioase. Manipulați toate probele ca și când ar putea să transmită HIV sau hepatită. Utilizați întotdeauna vârful proaspete de pipetă pentru fiecare etapă pentru a evita contaminarea încrucișată. Nu eliminați produsul în mediul înconjurător.

Orice incident grav [astfel cum este definit în Regulamentul (UE) 2017/746 privind dispozitivele medicale de diagnosticare in vitro] care a avut loc trebuie raportat la FertiPro NV și, dacă este cazul, la autoritatea competentă a statului membru al UE în care este stabilit utilizatorul și/sau pacientul.

BIBLIOGRAFIE

1. Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril.* 1988;49(3):497-504.
2. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl.* 1990;13(6):433-51.
3. Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod.* 1990;5(6):639-48.
4. Geneva: World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021:sixth edition.
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183-97.
6. Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril.* 1987;47(3):460-5.
7. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1143-57.
8. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
9. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
10. Johansson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update.* 2000;6(4):404-12.

GLOSAR DE SIMBOLURI

Simboluri definite în ISO 15223



Număr catalog



Codul lotului



Consultați instrucțiunile de utilizare



Producător



Diagnosticul in vitro



Limită de temperatură



Data limită de utilizare



A se păstra departe de lumina soarelui

Simbol definit în IVDR 2017/746



Numărul 2797 pentru marcajul CE de către organismul notificat

Simbol definit în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 [CLP].



GHS08
Pericol grav pentru sănătate



GHS02
Lichid inflamabil



GHS06
Toxicitate acută



GHS07
Pericol pentru sănătate



GHS05:
Coroziunea/iritarea pielii