



LeucoScreen Plus

Semikvantitatívna histochemická súprava na stanovenie peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek v ľudskej sperme

IVD

ID dokumentu: FP09 I111 R01 B.2

Aktualizácia: 14/05/2024

OSAHUJE MATERIÁL

Katálógové číslo

LeucoScreen Plus

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

TECHNICKÁ PODPORA PRE ZÁKAZNÍKOV

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

*Len na diagnostické použitie in vitro.**Reagencia je určená len na profesionálne použitie.*

VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

Väčšina ľudských ejakulátov obsahuje leukocyty, pričom ich prevládajúcou formou v ľudskej sperme sú peroxidáza-pozitívne granulocyty⁽¹⁻⁴⁾. Nadmerná prítomnosť týchto buniek (leukocytospermia) môže naznačovať prebiehajúcu infekciu reprodukčného systému. Leukocytospermia môže byť spojená aj s poruchami profilu spermií (zníženie pohyblivosti spermií a celistvosti DNA, zvýšenie viskozity spermií, ako aj porucha funkcie spermií v dôsledku oxidačného stresu a/alebo vylučovanie cytotoxických cytokínov takýmito bielymi krvinkami)^(5, 6). Hoci leukocytospermia nie je absolútnym indikátorom neplodnosti, tento stav sa pozoruje v priemere u 10 až 20 % všetkých neplodných mužov⁽⁷⁾.

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) sa prítomnosť viac ako jedného milióna peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek (WBC) na 1 ml ejakulátu považuje za abnormálnu a označuje sa ako „leukocytospermia“⁽⁴⁾. O tejto hranici však prebieha diskusia, pretože niektorí ju považujú za príliš nízku a iní naopak za príliš vysokú. Reálne však boli zaznamenané⁽⁷⁻⁹⁾ hraničné hodnoty od 0.2 x10⁶ do 2x10⁶.

Pri prekročení hranice jedného milióna peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek na 1 ml ejakulátu je potrebné vykonať mikrobiologické testy, aby sa zistilo, či ide o infekciu v prídavných pohlavných žľazách. Posúdenie markerov prídavných pohlavných žliaz môže poskytnúť ďalšie užitočné informácie o správnom fungovaní nadsemenníkov (EpiScreen Plus, FertiPro NV), semenných mechúrikov (Fructose Test, FertiPro NV) alebo prostaty. Dôležité je, že neprítomnosť leukocytov nevyklučuje možnosť infekcie prídavných pohlavných žliaz.

URČENÝ ÚČEL

LeucoScreen Plus je semikvantitatívna, neautomatizovaná histochemická a diagnostická súprava na stanovenie peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek v ľudskej sperme.

Počet testov, ktoré možno vykonať so súpravou LeucoScreen Plus, nie je stanovený, súprava by však mala postačovať na 40 dní analýz počas jej životnosti (umožňuje pripraviť 20 pracovných roztokov, ktoré zostanú stabilné počas dvoch po sebe nasledujúcich dní).

MATERIÁL DODÁVANÝ S TESTOM

*Reagencia 1 – 6 ml roztoku substrátu (4-CN v metanole)**Reagencia 2 – 300 µl 30 % peroxidu vodíka**Reagencia 3 – 22 ml tmivého roztoku**Reagencia 4 – 1.2 ml kontrastného farbiaceho roztoku*

Osvedčenie o analýze a doklad o bezpečnosti materiálu (MSDS) sú k dispozícii na požiadanie alebo si ich môžete stiahnuť z našej webovej stránky (www.fertipro.com).

POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU DODÁVKY

Mikroskopické sklíčka, krycie sklíčka, skúmavky (Eppendorf), pipety, mikroskop s jasným poľom.

Poznámka: *Odporúča sa používať svetelný mikroskop a nie mikroskop s fázovým kontrastom, pretože by mohol spôsobovať problémy pri interpretácii.*

PRINCÍP TESTU

Pri analýze typickej spermy je veľmi ťažké odlišiť biele krvinky od iných typov okrúhlych buniek vo vzorke spermy (napríklad spermatogénnych progenitorových buniek⁽¹⁰⁾). LeucoScreen Plus využíva vnútornú peroxidázovú aktivitu určitých bielych krviniek, a preto sa môže použiť na odlišenie peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek (napr. polymorfonukleárných (PMN) granulocytov a makrofágov) vo vzorke ľudskej spermy od iných typov okrúhlych buniek. V prítomnosti reagencie č. 2 (H₂O₂) myeloperoxidáza v leukocytových granulách spôsobuje oxidovanie reagencie č. 1 (4-CN) na modrofialový precipitát (4-chlór-1-naftón). Reagencia č. 4 obsahuje kontrastný farbiaci roztok na uľahčenie rozlíšenia peroxidáza-pozitívnych okrúhlych buniek od peroxidáza negatívnych okrúhlych buniek.

METÓDA

Pred prvým použitím súpravy LeucoScreen Plus dôrazne odporúčame postupovať podľa školiaceho programu a pozrieť si video s ukážkou, ktoré možno nájsť na našej webovej stránke. Video si môžete stiahnuť aj naskenovaním tohto QR kódu:



Typy vzoriek

Test by sa mal vykonávať na čerstvých vzorkách ľudskej spermy, ktoré obsahujú viac ako 1x10⁶ okrúhlych buniek na 1 ml.

Odber vzoriek

Pri odbere spermií masturbáciou je potrebné používať štandardné nádoby na odber spermií, zvyčajne polypropylénové, a zároveň by sa mal vykonať test prežitia/motility spermií. Ak sa pri odbere spermy masturbácia neodporúča, je potrebné používať plastové kondómy, ktoré nie sú pre spermu toxické. Pred odberom vzorky spermy temperujte nádobu na odber spermií pri izbovej teplote s cieľom zamedziť veľkým teplotným zmenám, ktoré by mohli ovplyvniť spermie. Test by sa mal vykonať v ten istý deň ako odber spermií.

Upozornenie pred použitím

Výrobok nepoužívajte, ak pri dodaní súpravy je uzáver fľaše otvorený alebo poškodený.

Príprava reagiencií

Reagencia č. 1 by mala obsahovať číru tekutinu; ak tekutina zožltla, súpravu nepoužívajte.

Metóda

- Pri stanovení koncentrácie spermií počas bežnej analýzy spermy spočítajte počet okrúhlych buniek. Vypočítajte a zapíšte celkovú koncentráciu okrúhlych krviniek v miliónoch na 1 ml, pretože ju budete potrebovať pri výpočte koncentrácie peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek. Ak koncentrácia okrúhlych buniek prekročí 1x10⁶ na 1 ml, indikuje sa test LeucoScreen Plus.
- Pripravte pracovný roztok: Do skúmavky Eppendorf pridajte nižšie uvedené objemy a dôkladne premiešajte.
 - 200 µl reagencie č. 1
 - 5 µl reagencie č. 2
 - 1 ml reagencie č. 3
 Tento pracovný roztok je stabilný 48 hodín, ak sa skladuje pri teplote 2 – 8 °C a je chránený pred (snečným) žiarením.
- Odoberte 10 µl vzorky spermy a pridajte 20 µl pracovného roztoku. Dôkladne premiešajte.
- Inkubujte dve minúty pri izbovej teplote **v tme**.
- Prenešte 10 µl zmesi do stredu mikroskopického sklíčka a pridajte 10 µl reagencie č. 4. Dôkladne premiešajte hranou krycieho sklíčka.
- Zakryte krycím sklíčkom.
- Spočítajte a klasifikujte celkovo 200 okrúhlych buniek pri zväčšení 400x. Skenujte rôzne zorné polia mikroskopu (podľa možnosti 20).
- Všetky použité reagenty a materiály zlikvidujte po každom teste.

Poznámka: V niektorých vzorkách spermy môžete zvýšiť koncentráciu okrúhlych buniek s cieľom uľahčiť ich počítanie. Na tento účel odstreďte vzorku 15 minút pri 350 x g, odstráňte určitý objem vzorky spermy a peletu znovu rozpustíte.

V prípade veľmi vysokej koncentrácie okrúhlych buniek (t. j. nad 20×10^6 na ml) sa dôrazne odporúča zriediť vzorku v PBS alebo v médiu FertiCult™ Flushing medium.

INTERPRETÁCIA

- Peroxidáza-pozitívne okrúhle bunky: obsahujú (modrasté) čierne granule a majú antracitovosivú cytoplazmu. Táto antracitová oblasť môže pokrývať celú bunku alebo len jej časť.
- Peroxidáza-negatívne okrúhle bunky: zostávajú nezafarbené alebo môžu byť sfarbené na ružovo. Granule pozorované v nezafarbených bunkách nie sú obklopené typickou antracitovou farbou, ktorá sa vyskytuje v pozitívnych bunkách.

VÝPOČET KONCENTRÁCIE PEROXIDÁZA-POZITÍVNYCH BIELYCH KRVINIEK

- Podiel peroxidáza-pozitívnych buniek možno vypočítať takto:

$$\text{PODIEL POZITÍVNYCH OKRÚHLÝCH BUNIEK} = \frac{\text{"Počet POZITÍVNYCH okrúhlych buniek"} / (\text{"Počet POZITÍVNYCH okrúhlych buniek"} + \text{počet NEGATÍVNYCH okrúhlych buniek})}{1}$$

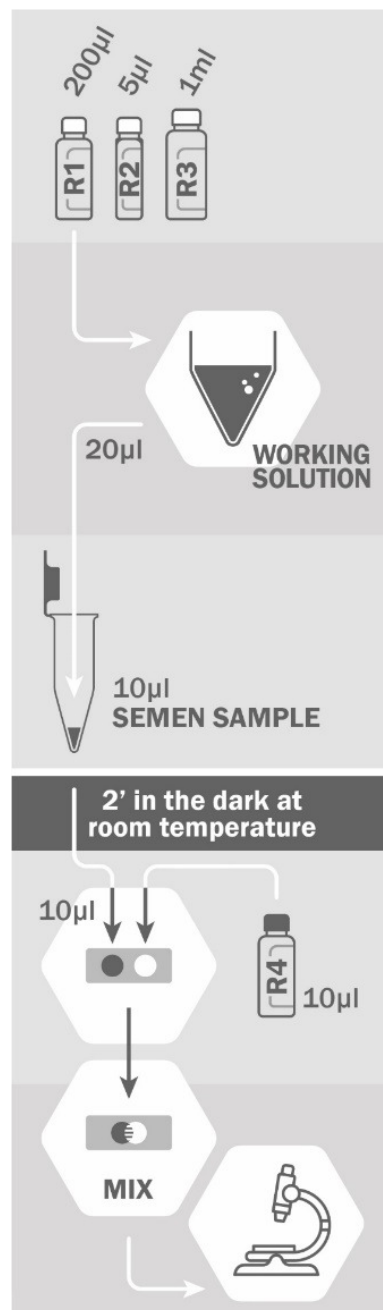
- Vypočítajte koncentráciu peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek vo vzorke spermy takto:

$$\text{KONCENTRÁCIA (v miliónoch na 1 ml)} = \text{podiel pozitívnych okrúhlych buniek} \times \text{celková koncentrácia okrúhlych buniek}$$

Príklad:

- Celková koncentrácia okrúhlych buniek je 2 mil/ml (stanovená počas analýzy koncentrácie spermií)
- Testom LeucoScreen Plus sa zistí 120 pozitívnych okrúhlych buniek a 80 negatívnych okrúhlych buniek.
- Podiel pozitívnych okrúhlych buniek = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Koncentrácia peroxidáza-pozitívnych bielych krviniek = $0.6 \times 2 \text{ mil/ml} = 1.2 \text{ mil/ml}$

Grafické znázornenie protokolu:



OBMEDZENIA METÓDY

Tento test slúži ako pomôcka pri diagnostike neplodnosti u mužov a jeho výsledky sa musia interpretovať – tak ako v prípade iných testov – spolu s klinickým nálezom a údajmi z anamnézy. Pri teste LeucoScreen Plus sa sfarbiajú len peroxidáza-pozitívne biele krvinky, iné typy bielych krviniek (napr. lymfocyty a monocyty) sa nedetegujú.

VÝKONNOSTNÉ CHARAKTERISTIKY

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť: $CV_{intra} < 15\%$, $CV_{inter} < 15\%$

Percento pozitívnej zhody: 88%, percento negatívnej zhody: 96%

SKLADOVANIE/LIKVIDÁCIA

- Súprava je stabilná najmenej 12 mesiacov od dátumu výroby (aj po otvorení).
- Nepoužívajte po dátume expirácie, ktorý je uvedený na etikete výrobku.
- Reagencie skladujte pri teplote od 2 °C do 25 °C.
- Nezmrazujte.
- Chráňte pred (slniečným) žiarením.
- Flaše musia byť vždy pevne uzavreté.
- Pracovný roztok sa môže skladovať maximálne 48 hodín pri teplote 2 – 8 °C mimo dosahu (slniečného) žiarenia.
- Reagencie sa musia zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi na likvidáciu zdravotníckych pomôcok.

PRECAUȚII

Odporúča sa používať rukavice.

Reagencia č. 1 obsahuje metanol: vysoko horľavá kvapalina vrátane výparov, toxická po požití, kontakte s pokožkou alebo pri vdýchnutí, spôsobuje poškodenie orgánov.

Reagencia č. 2 obsahuje H₂O₂: škodlivá po požití alebo pri vdýchnutí; spôsobuje vážne poškodenie očí. Používajte ochranu očí/tváre.

Reagencia č. 3 obsahuje ProClin 950: Spôsobuje vážne popáleniny kože a poškodenie očí, môže spôsobiť alergickú kožnú reakciu.

Všetky vzorky spermy by sa mali považovať za potenciálne infekčné. So všetkými vzorkami zaobchádzajte, ako keby

mohli prenášať HIV alebo hepatitídu. Pri každom kroku používajte nové špičky na pipety, aby ste zabránili krížovej kontaminácii. Výrobok nevyhadzujte ako odpad do okolitého prostredia.

V prípade akejkoľvek závažnej nehody (v zmysle vymedzenia tohto pojmu v nariadení (EÚ) č. 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro) je potrebné takúto udalosť nahlásiť spoločnosti FertiPro NV a v relevantných prípadoch príslušnému orgánu v členskom štáte, v ktorom má používateľ alebo pacient bydlisko.

BIBLIOGRAFIA

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 leucocyte 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.

SLOVNÍK SYMBOLOV

Symbol vymedzený v norme ISO 15223



Katalógové číslo



Kód šarže



Prečítajte si návod na použitie



Výrobca



Diagnostika in vitro



Teplotný limit



Dátum spotreby



Uchovávajte mimo slnečného žiarenia

Symbol vymedzený v nariadení 2017/746



Označenie CE oboznámeným orgánom 2797

Symbol vymedzený v nariadení (ES) č. 1272/2008 [CLP]



GHS08
Závažné ohrozenie zdravia



GHS02
Horľavá kvapalina



GHS06
Horľavá kvapalina



GHS07
Ohrozenie zdravia



GHS05:
Žieravosť/dráždivosť pre kožu