

LeucoScreen Plus

İnsan semeninde peroksidaz pozitif akyuvarların belirlenmesi için yarı kantitatif histokimyasal kit

IVD

Belge Kimliği: FP09 I111 R01 B.2
Güncelleme: 14/05/2024

DAHİL OLAN MALZEME

Katalog numarası

LeucoScreen Plus

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

MÜŞTERİ-TEKNİK DESTEK

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

Yalnızca in vitro teşhiste kullanım içindir.
Yalnızca profesyonel kullanım için reaktif.

GENEL BİLGİLER

Çoğu insan ejakülatı lökosit içerir ve insan semenindeki baskın lökosit formu peroksidaz pozitif granülositlerdir⁽¹⁻⁴⁾. Bu hücrelerin aşırı varlığı (lökositospermi) üreme yolu enfeksiyonunun varlığını gösterebilir. Lökositospermi ayrıca semen profilindeki kusurlarla da ilişkili olabilir (sperm hareketliliğinde ve DNA bütünlüğünde azalma, sperm viskozitesinin yükselmesi ve ayrıca oksidatif stres sonucu sperm işlevinin kaybı ve/veya bu akyuvarlar tarafından sitotoksik sitokinlerin salgılanması)^(5, 6). Lökositospermi kısırlığın mutlak bir göstergesi olmasa da, bu durum ortalama olarak tüm infertil erkeklerin %10 ıla %20'sinde görülür⁽⁷⁾.

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, ml ejakülat başına bir milyondan fazla peroksidaz pozitif akyuvarın (WBC) varlığı anormal kabul edilir ve "lökositospermi" olarak etiketlenir⁽⁸⁾. Bununla birlikte, bazıları bu değeri çok düşük ve diğerleri çok yüksek bulduğu için bu eşik tartışılmaktadır. Gerçekten de, 0,2 x10⁶ - 2x10⁶ arasındaki eşik seviyeleri bildirilmiştir⁽⁷⁻⁹⁾.

Ml ejakülat başına bir milyon peroksidaz pozitif WBC eşiği aşıldığında, mukoz bezi enfeksiyonu olup olmadığını araştırmak için mikrobiyolojik testler yapılmalıdır. Mukoz bezi belirteçlerinin değerlendirilmesi, epididim (EpiScreen Plus, FertiPro NV), seminal veziküllerin (Fructose Test, FertiPro NV) veya prostatın düzgün çalışması hakkında ek yararlı bilgiler sağlayabilir. Önemli olarak, lökositlerin yokluğu, mukoz bezi enfeksiyonu olasılığını dışlamaz.

KULLANIM AMACI

LeucoScreen Plus, insan semeninde peroksidaz pozitif akyuvarların belirlenmesi için yarı kantitatif, otomatik olmayan, histokimyasal ve teşhis kitidir.

LeucoScreen Plus kiti ile yapılabilecek test sayısı belirtilmemiştir, bunun yerine kit, kitin ömrü boyunca 40 günlük analiz için tasarlanmıştır (art arda 2 gün boyunca stabil olan 20 çalışma çözeltisi yapılabilir).

TESTE DAHİL OLAN MALZEME

Reaktif 1 – 6 ml Substrat çözeltisi (metanol içinde 4-CN)

Reaktif 2 – 300 µl %30 Hidrojen peroksit

Reaktif 3 – 22 ml Tampon çözeltisi

Reaktif 4 – 1.2 ml Karşı boya çözeltisi

Analiz sertifikası ve MSDS talep üzerine temin edilebilir veya web sitemizden (www.fertipro.com) indirilebilir.

GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEME

Mikroskop lamları, kapak camları, test tüpleri (Eppendorf), pipetler, parlak alan mikroskobu.

Not: *Işık mikroskobu kullanmanız ve faz kontrastlı mikroskop kullanmamanız önerilir, ikincisi yorumlama zorluklarına yol açabilir.*

TEST PRENSİBİ

Standart bir semen analizi yapılırken semen örneğinde akyuvarlar ile diğer türde yuvarlak hücreleri birbirinden ayırmak son derece zordur (örneğin spermatojenik progenitor hücreler⁽¹⁰⁾). LeucoScreen Plus, belirli akyuvarların intrinsik peroksidaz aktivitesini kullanır ve bu nedenle insan semen örneğindeki peroksidaz pozitif akyuvarları (örneğin polimorfonükleer (PMN) granülositler ve makrofajlar) diğer yuvarlak hücre tiplerinden ayırt etmek için kullanılabilir.

Reaktif 2'nin (H₂O₂) varlığında, lökosit granüllerindeki miyeloperoksidaz Reaktif 1'i (4-CN) mavimsi-mor bir çökeltiye (4-kloro-1-nafton) oksitleyecektir. Reaktif 4, peroksidaz pozitif yuvarlak hücreler ile peroksidaz negatif yuvarlak hücrelerin ayırt edilmesini kolaylaştırmaya yönelik bir karşı boya çözeltisi içerir.

YÖNTEM

LeucoScreen Plus kitini ilk kez kullanmadan önce eğitim programını tanıtım videomuzu izlemenizi şiddetle tavsiye ederiz; her ikisine web sitemizden ulaşabilirsiniz. Video, şu QR kodu taranarak da indirilebilir:



Numune türleri

Test, ml başına en az 1x10⁶ yuvarlak hücre içeren yeni insan semen örnekleri üzerinde yapılmalıdır.

Numune toplama

Semen masturbasyon yoluyla toplandığında, tipik olarak polipropilen ve sperm sağkalımı/sperm hareketliliği test edilmiş standart semen toplama kapları kullanılmalıdır. Masturbasyon yoluyla semen toplanması istenmediğinde semen-toksik olmayan plastik prezervatifler kullanılmalıdır. Spermatozoayı etkileyebilecek büyük sıcaklık değişikliklerini önlemek için semen örneğini eklemeyen önce semen toplama kabını oda sıcaklığında

tutun. Test, semen toplandıktan sonra aynı gün içinde yapılmalıdır.

Kullanım öncesi uyarı

Kit teslim edildiğinde şişelerin mührü açılmış veya bozulmuşsa ürünü kullanmayın.

Reaktif hazırlama

Reaktif 1 berrak bir sıvı içermelidir, sıvı sararmışsa kiti kullanmayın.

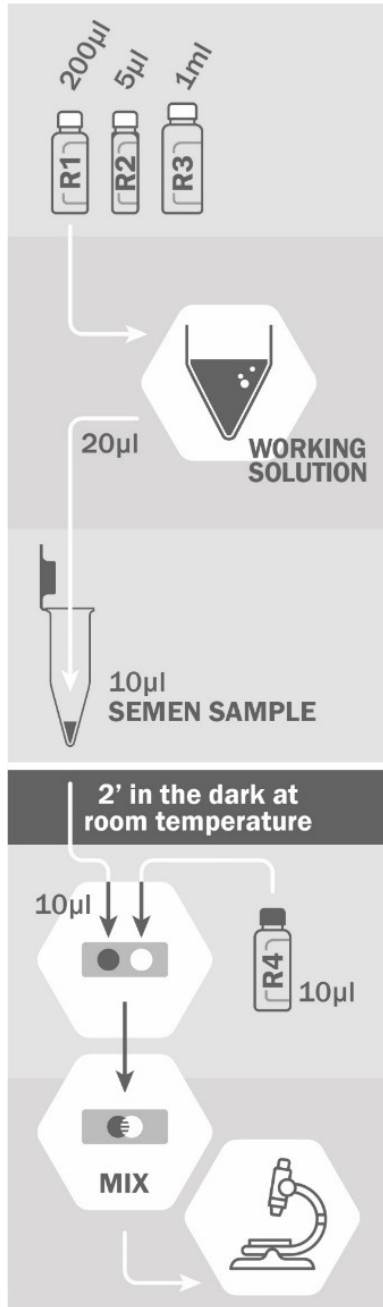
YÖNTEM

- Rutin semen analizi sırasında sperm konsantrasyonunu belirlerken yuvarlak hücreleri sayın. Konsantrasyon peroksidazpozitif akyuvarların hesaplanması için gerekli olacağından, ml/ml cinsinden yuvarlak hücrelerin toplam konsantrasyonunu hesaplayın ve not edin. Yuvarlak hücre konsantrasyonu ml başına 1x10⁶ seviyesini aştığında LeucoScreen Plus testi yapılabilir.
- Çalışma çözeltisini hazırlayın: Aşağıdaki hacimleri bir Eppendorf tüpüne ekleyin ve iyice karıştırın.
 - 200 µl Reaktif 1
 - 5 µl Reaktif 2
 - 1 ml Reaktif 3
 Bu çalışma çözeltisi 2-8°C arasında saklandığında ve ışıktan (güneş) korunduğunda 48 saat stabildir.
- Semen örneğinden 10 µl alın ve 20 µl çalışma çözeltisi ekleyin. İyice karıştırın.
- Karanlıkta** ve oda sıcaklığında iki dakika inkübe edin.
- Karışımın 10 µl'sini bir mikroskop camının ortasına aktarın ve 10 µl Reaktif 4 ekleyin. Cam parçanın kenarını kullanarak iyice karıştırın.
- Cam parça ile örtün.
- 400x büyütme kullanarak toplam 200 yuvarlak hücreyi sayın ve sınıflandırın. Farklı mikroskobik alanları tarayın (tercihen 20).
- Her testten sonra kullanılan tüm reaktifleri ve malzemeleri atın.

Not: *Bazı semen örneklerinde, hücre sayımını kolaylaştırmak için yuvarlak hücre konsantrasyonunu zenginleştirmeyi tercih edebilirsiniz. Bu nedenle örneği 350 g'da 15 dakika santrifüje edin, semen örneğinin bir miktarını çıkarın ve peleti yeniden süspansiyon edin.*

Çok yüksek yuvarlak hücre konsantrasyonu durumunda (yani ml başına 20x10⁶ üzerinde), örneğin PBS veya FertiCult™ Flushing medium içinde seyreltilmesi şiddetle tavsiye edilir.

Protokolün grafiksel sunumu:



YORUM

- Peroksidaz pozitif yuvarlak hücreler: (mavimsi-) siyah granüller içerir ve antrasit grisi bir sitoplazmaya sahiptir. Bu antrasit alan tüm hücreyi veya sadece bir kısmını kaplayabilir.
- Peroksidaz negatif yuvarlak hücreler: boyasız kalır veya pembe renkli olabilir. Boyanmamış hücrelerde görülen granüller, pozitif hücrelerde görülen tipik antrasit rengiyle çevrili değildir.

PEROKSİDAZ POZİTİF AKYUVARLARIN KONSANTRASYONUNUN HESAPLANMASI

- Peroksidaz pozitif hücrelerin oranını aşağıdaki gibi hesaplayın:

$$\text{POZİTİF YUVARLAK HÜCRELERİN ORANI} = \frac{\text{POZİTİF yuvarlak hücre sayısı}}{(\text{POZİTİF yuvarlak hücre sayısı} + \text{NEGATİF yuvarlak hücre sayısı})}$$

- Şimdi semen örneğindeki peroksidaz pozitif akyuvarların konsantrasyonunu aşağıdaki şekilde hesaplayın:

$$\text{KONSANTRASYON (mil/ml)} = \text{Pozitif yuvarlak hücrelerin oranı} \times \text{yuvarlak hücrelerin toplam konsantrasyonu}$$

Örnek:

- Yuvarlak hücrelerin toplam konsantrasyonu 2 mil/ml'dir (sperm konsantrasyon analizi sırasında belirlenir)
- LeucoScreen Plus testi ile 120 yuvarlak hücre pozitif, 80 yuvarlak hücre negatif bulunmuştur
- Pozitif yuvarlak hücrelerin oranı = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Peroksidaz pozitif akyuvarların oranı = $0.6 \times 2 \text{ mil/ml} = 1.2 \text{ mil/ml}$

YÖNTEMİN SINIRLARI

Bu test erkek infertilitesinin teşhisinde yardımcıdır ve diğer biyolojik testlerde olduğu gibi, sonuçların yorumlanması klinik bulgular ve hikaye alma verileri çerçevesinde yapılmalıdır. LeucoScreen Plus testi sadece peroksidaz pozitif WBC'yi boyar, diğer WBC türleri (örneğin lenfositler ve monositler) tespit edilmez.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$
Pozitif eşleşme yüzdesi: 88%, negatif eşleşme yüzdesi: 96%

DEPOLAMA / BERTARAF

- Kit, üretim tarihinden sonra en az 12 ay boyunca stabildir (açıldıktan sonra dahi).
- Ürün etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Reaktifleri 2°C ile 25°C arasında saklayın.
- Dondurmayın.
- Işıktan (güneş) koruyun.
- Şişeler her zaman sıkıca kapalı tutulmalıdır.
- Çalışma çözeltisi en fazla şu kadar saklanabilir: 2-8°C'de 48 saat, ışıktan (güneş) korunur.
- Reaktifler, tıbbi cihazların bertarafına ilişkin yerel düzenlemelere uygun olarak atılmalıdır.

ÖNLEMLER

Eldiven kullanılması tavsiye edilir.

Reaktif 1 metanol içerir: yüksek düzeyde yanıcı sıvı ve buhar, yutulduğunda toksiktir, cilt ile temas ettiğinde veya solunduğunda organlara zarar verir.

Reaktif 2 H₂O₂ içerir: yutulduğunda veya solunduğunda zararlıdır; gözde ciddi hasara neden olur. Göz / yüz koruması kullanın.

Reaktif 3 ProClin 950 içerir: Ciltte ciddi yanıklara ve gözlerde hasara neden olur, alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir.

Tüm semen örnekleri potansiyel olarak bulaşıcı şekilde değerlendirilmelidir. Tüm numuneleri HIV veya hepatit bulaştırabilecekmiş gibi kullanın. Çapraz kontaminasyonu önlemek için her adımda yeni pipet uçları kullanın. Ürünü çevreye atmayın.

Meydana gelen herhangi bir ciddi olay (Avrupa In Vitro Teşhis Tıbbi Cihaz Yönetmeliği 2017/746'da tanımlanan şekilde) FertiPro NV'ye ve varsa kullanıcının ve/veya hastanın yerleşik olduğu AB Üye Devletinin yetkili makamına bildirilmelidir.

KAYNAKÇA

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.

SEMBOLLER SÖZLÜĞÜ

ISO 15223'te tanımlanan semboller



Katalog numarası



Parti kodu



Kullanım talimatlarına bakın



Üretici



In Vitro Teşhis



Sıcaklık sınırı



Son kullanma tarihi



Güneş ışığından uzak tutun

IVDR 2017/746'da tanımlanan şekilde sembol



Onaylanmış Kuruluş 2797 tarafından CE işareti

Yönetmelik No. 1272/2008 [CLP]'de (EC) tanımlanan şekilde sembol



GHS08
Ciddi sağlık tehlikesi



GHS02
Yanıcı sıvı



GHS06
Akut toksisite



GHS07
Sağlık tehlikesi



GHS05:
Ciltte korozyon/tahriş