

LeucoScreen Plus



Документ FP09 I111 R01 A.4

Оновлено 01/02/2021

Комплект для напівкількісного визначення пероксидазо-позитивних лейкоцитів у спермі людини гістохімічним методом.

Діагностичний набір для in vitro, тільки для професійного використання.

Загальна інформація:

Лейкоцити містяться в еякуляті більшості чоловіків, здебільше з яких пероксидазо-позитивні гранулоцити^{1,2,3,4}.

Надмірна їх кількість (лейкоцитоспермія) свідчить про наявність інфекції статевих шляхів. Крім того, лейкоцитоспермія може бути пов'язана з патологіями сім'яної рідини (зниження рухливості сперматозоїдів та цілісності ДНК, підвищення в'язкості сперми, а також зниження фертильності сперми за рахунок «окисного» стресу і / або секреції цитотоксичних сполук – цитокинів білими кров'яними клітинами). Незважаючи на те, що лейкоцитоспермія не є абсолютний індикатор безпліддя, ця умова спостерігається в середньому у 10 - 20% всіх безплідних чоловіків⁸. Коли проводиться типовий аналіз сперми, дуже важко диференціювати білі кров'яні клітини від інших типів круглих клітин у зразку сперми (Наприклад, сперматогенні клітини-попередники⁷). Це відносно швидкий і недорогий метод диференціювання пероксидазних позитивних білих кров'яних клітин від інших круглих клітин в зразку сперми, використовуючи внутрішню активність пероксидази з цих клітин⁷. LeucoScreen Plus заснований саме на цій техніці, і тому може бути використаний для забарвлення пероксидаза - позитивних білих кров'яних клітин в зразках сперми людини.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, присутність більш ніж одного мільйона пероксидаза - позитивних білих клітин крові (ПБК) на мл еякуляту виявляється ненормальною та маркується як лейкоцитоспермія "4. Однак цей поріг знаходиться під дискусією, оскільки деякі знайшли це значення занадто низьким, а інші занадто високим. Дійсними, зареєстрованими пороговими рівнями⁸⁻¹⁰ є від $0,2 \times 10^6$ - 2×10^6 .

При перевищенні порогу одного мільйона позитивних ПБК на 1 мл еякуляту, рекомендовано проводити мікробіологічні тести щоб виявити їх наявність в додаткових залозах. Оцінка маркерів додаткових залоз може надати корисну інформацію про належне функціонування епідімісу (EpiScreen Plus, FertiPro nv), семенних пухирців (тест на фруктозу, FertiPro nv) або простати. Важливо, що відсутність лейкоцитів не виключає можливості інфекції залоз.

Число випробувань, які можуть бути виконані за допомогою набору LeucoScreen Plus не вказано, замість того, набір був розроблений на 40 днів аналізу протягом терміну придатності набору (може бути виготовлено 20 робочих розчинів, які є стабільними 2 дні поспіль).

Матеріали, включені до набору:

Реагент 1 – 6 мл розчин субстрату (4-CN в метанолі).

Реагент 2 – 300 μ л 30% пероксиду водню.

Реагент 3 – 22мл буферного розчину

Реагент 4 – 1.2мл розчину контурної краски

Сертифікат аналізу та MSDS можна завантажити з веб-сайту (www.fertipro.com).

Матеріали, не включені до набору:

Предметне скло, Покривне скло, пробірки (еппандорф), Піпетки, світловий мікроскоп

Примітка: Рекомендується використовувати світловий мікроскоп, а не фазовоконтрастний, оскільки останній може призвести до труднощів при інтерпретації.

Тип зразку

Тест слід проводити на свіжих зразках сперми, що містять більше ніж 1×10^6 круглих клітин на мл. Тест необхідно виконувати в день збору сперми.

Принцип теста

Мієлопероксидаза, присутня в гранулах певних лейкоцитів, окислює 4-CN до синьо-фіолетового 4-хлор-1-нафтонного осаду, використовуючи H_2O_2 як окислювач. Реагент 4 містить розчину контурної краски для відмінності пероксидазо-позитивних круглих клітин від пероксидазо-негативних круглих клітин.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

- Пероксидазо-позитивні круглі клітини: містять (синювато) чорні гранули і мають антрацитово-сіру цитоплазму. Ця антрацитова зона може охоплювати всю клітину або лише її частину.

- Пероксидазо-негативні круглі клітини: залишаються незабарвленими або можуть бути рожевого кольору. Гранули, помічені в незабарвлених клітинах, не оточені типовим антрацитовим кольором як в позитивних клітинах.

ВИКОНАННЯ

У незалежному валідаційному дослідженні різні оператори проаналізували 44 зразки з LeucoScreen та LeucoScreen Plus. Робочі характеристики:

- Достовірність: Обидва набори забезпечили порівнянні результати на основі аналізу Passing Bablok .

- Точність: Обидва набори дозволяють розрізнити пероксидазо-позитивні та негативні круглі клітини із порівнянною точністю (LeucoScreen Plus: CVintra: 12%; CVinter: 10%)

ПЕРЕД ВИКОРИСТАННЯМ

Реагент 1 повинен бути прозорою рідиною, не використовувати набір, якщо рідина стала жовтою.

Метод

Перед першим використанням набору LeucoScreen Plus, наполегливо рекомендуємо дотримуватися навчальної програми та переглянути наше демонстраційне відео, що є доступними на нашому веб-сайті. Відео також можна завантажити, відсканувавши QR-код:



1. Порахувати кількість круглих клітин під час визначення концентрації сперми під час рутинного аналізу сперми. Обчислити та записати загальну концентрацію круглих клітин у млн / мл, оскільки це може бути використано для розрахунку концентрації пероксидазо-позитивних білих кров'яних тілець. Тест LeucoScreen буде індикатором коли загальна концентрація клітин перевищує 1×10^6 на мл, зазначений.

2. Приготування робочого розчину. Додати всі реагенти в пробірку Еппендорфа і ретельно перемішати:

- 200 мкл реагенту 1
- 5 мкл реагенту 2
- 1,0 мл реагенту 3

Цей розчин стабільний протягом 48 годин при зберіганні у темряві при температурі 2 °С - 8 °С.

3. Змішати 10 мкл semen з 20 мкл робочого розчину. Ретельно перемішувати.

4. Інкубувати протягом двох хвилин у темряві.

5. Перенести 10 мкл розчину на середину предметного скла та додати 10 мкл реагенту 4. Ретельно перемішувати, використовуючи краєчок покривного скла.

6. Накрити покривним склом.

7. Підрахуйте та класифікуйте загалом 200 круглих клітин при збільшенні 400x. Прочитайте різні мікроскопічні поля (бажано 20).

Примітка: У деяких зразках сперми можна віддати перевагу збагаченню круглої клітини концентрація для полегшення підрахунку клітин. Тому слід центрифугувати зразок протягом 15 хвилин при 350g, видалити трохи зразка сперми та ресуспендувати.

У випадку дуже високої концентрації круглих клітин (тобто вище 20x10⁶ на мл), наполегливо рекомендується розбавляти зразок у PBS або в середовищі для промивання FertiCult™.

Розрахунок концентрації пероксидазо-позитивних білих кров'яних клітин (на далі БКК)

- Обчислити частку пероксидазо-позитивних клітин таким чином:

ПРОПОРЦІЯ ПОЗИТИВНИХ КРУГЛИХ КЛІТИН=

Кількість позитивних круглих клітин : (Кількість позитивних круглих клітин+ Кількість негативних круглих клітин)

- Тепер обчислити концентрацію пероксидазо-позитивних білих кров'яних тілець у зразку сперми таким чином:

КОНЦЕНТРАЦІЯ (млн/мл) =

Пропорція позитивних круглих клітин x загальна концентрація круглих клітин

Приклад:

- Загальна концентрація круглих клітин становить 2 млн / мл (визначається при аналізі концентрації сперми)

- За допомогою тесту LeucoScreen, 120 круглих клітин виявлено позитивними, а 80 круглих клітин вважаються негативними

ПРОПОРЦІЯ ПОЗИТИВНИХ КРУГЛИХ КЛІТИН= 120 : (120+80) =0,6

КОНЦЕНТРАЦІЯ ПЕРОКСИДАЗА-ПОЗИТИВНИХ БІЛИХ КРОВ'ЯНИХ ТІЛЕЦЬ = 0,6 x 2млн/мл= 1,2 млн/мл

Зберігання та стабільність

Зберігати реактиви при температурі від 2 °С до 25 °С. Можливе транспортування або короточасне зберігання при підвищених температурах (до 5 днів при 37 °С). Не заморожувати. Зберігати в захищеному від світла місці. Комплект стабільний щонайменше протягом 12 місяців після дати виготовлення (навіть після відкриття), не використовувати після закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці. Ємності повинні бути постійно щільно закритими. Робочий розчин може зберігатися до 48 годин у темряві при температурі 2 °С - 8 °С, в захищеному від світла місці.

Обмеження методу.

Цей тест є допоміжним інструментом для діагностики чоловічого безпліддя, і, як і для інших біологічних тестів, інтерпретація результатів повинна проводитися в рамках клінічних знахідок та даних історії. LeucoScreen лише забарвлює пероксидазо-позитивні лейкоцити, інші типи лейкоцитів (наприклад, лімфоцити та моноцити) не можуть бути виявлені.

Запобіжні заходи

Рекомендується використовувати рукавички. Реагент 1 містить метанол: уникати вдихання пари. Реагент 2 містить H₂O₂: корозивний, викликає опіки. При попаданні на шкіру ретельно промити водою з милом. Носити захист для очей/обличчя. Всі зразки сперми слід вважати потенційно інфекційними. Обробляти всі зразки як потенційні переносники ВІЛу або гепатиту. Завжди використовувати свіжі накісники для піпеток на кожному кроці, щоб уникнути перехресного забруднення. Не викидати виріб у навколишнє середовище.

Бібліографія

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. Andrologia; 35:271-278.

Уповноважений представник в Україні
Фізична Особа Підприсмець Валах Наталія Миколаївна
 Україна, 65049 , м. Одеса, вул.Жаботинського,6
 Тел. (048) 795-67-45, (068) 254-52-66

REF LEUCO_PLUS



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