

LeucoScreen Plus

Ημιποσοτικό ιστοχημικό kit για τον προσδιορισμό των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων σε ανθρώπινο σπέρμα

Ταυτότητα εγγράφου: FP09 I111 R01 B.2

Ενημέρωση: 14/05/2024

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro

Αντιδραστήριο μόνο για επαγγελματική χρήση

υπεροξειδάση στρογγυλών κυττάρων και των αρνητικών στην υπεροξειδάση στρογγυλών κυττάρων.

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:



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.

ΣΥΛΛΟΓΗ & ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τυπικά δοχεία συλλογής σπέρματος, συνήθως από πολυπροπυλένιο και ελεγμένα ως προς την επιβίωση/κινητικότητα του σπέρματος, όταν το σπέρμα συλλέγεται με αυνανισμό. Μη τοξικά για το σπέρμα πλαστικά προφυλακτικά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όταν δεν είναι δυνατή η συλλογή σπέρματος με αυνανισμό. Διατηρήστε το δοχείο συλλογής σπέρματος σε θερμοκρασία δωματίου πριν προσθέσετε το δείγμα σπέρματος, ώστε να αποφύγετε τις μεγάλες μεταβολές της θερμοκρασίας που μπορεί να επηρεάσουν τα σπερματοζωάρια. Η εξέταση θα πρέπει να διενεργείται εντός της ίδιας ημέρας από τη συλλογή του σπέρματος.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ

Μη χρησιμοποιείτε το προϊόν εάν η σφράγιση των φιαλών είναι ανοιχτή ή είναι ελαττωματική κατά την παράδοση του kit.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

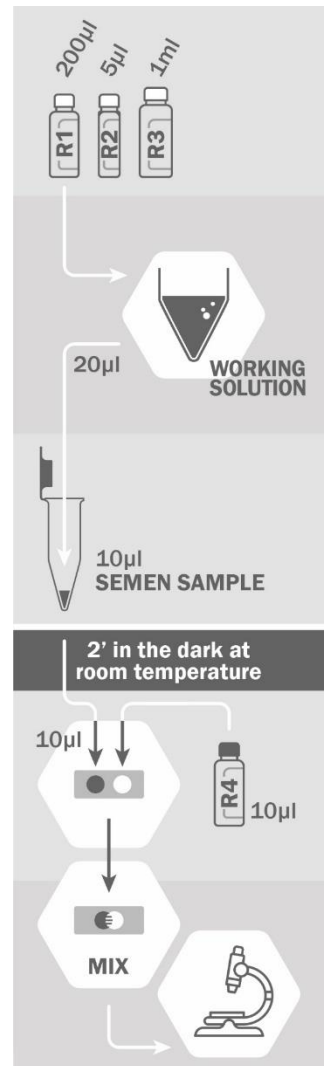
Το Reagent 1 θα πρέπει να περιέχει ένα διαυγές υγρό, μη χρησιμοποιήσετε το kit εάν το υγρό αποκτήσει κίτρινη όψη.

ΜΕΘΟΔΟΣ

- 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.
- Προετοιμάστε το διάλυμα εργασίας: Προσθέστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο Eppendorf 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).
- Μετά από κάθε μεμονωμένη εξέταση, απορρίψτε όλα τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια και υλικά.



ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

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 κυτταροτοξικών κυτταροκινών από αυτά τα λευκά αιμοσφαίρια)^{5,6}. Παρόλο που η λευκοκυτταροσπερμία δεν αποτελεί απόλυτη ένδειξη υπογονιμότητας, η πάθηση αυτή παρατηρείται κατά μέσο όρο στο 10 με 20% των υπογόνιμων ανδρών⁷.

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 από⁷⁻⁹ $0,2 \times 10^6$ – 2×10^6 .

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.

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το LeucoScreen Plus είναι ένα ημι-ποσοτικό, μη αυτοματοποιημένο, ιστοχημικό και διαγνωστικό kit για τον προσδιορισμό των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων σε ανθρώπινο σπέρμα.

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 μl 30% υπεροξειδίου υδρογόνου
- Αντιδραστήριο 3 – 22 ml ρυθμιστικού διαλύματος
- Αντιδραστήριο 4 – 1,2 ml of διαλύματος αντιχρώσης

Το πιστοποιητικό ανάλυσης και τα ΔΔΑΥ είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος ή μπορούν να μεταφορτωθούν από τον ιστότοπο (www.fertipro.com).

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ

Πλακίδια μικροσκοπίου, καλυπτρίδες, σωληνάκια (eppendorf), πιπέτες, μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

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

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

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 κυττάρων¹⁰). Το LeucoScreen Plus χρησιμοποιεί την εγγενή δραστηριότητα υπεροξειδάσης ορισμένων λευκών αιμοσφαιρίων και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων (π.χ. πολυμορφοπύρνηνα (PMN) κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα) σε ένα δείγμα ανθρώπινου σπέρματος από άλλους τύπους στρογγυλών κυττάρων.

Παρουσία αντιδραστήριου Reagent 2 (H_2O_2), η μυελοπεροξειδάση στα κοκκία των λευκοκυττάρων θα οξειδώσει το αντιδραστήριο Reagent 1 (4-CN) σε ένα γαλαζωπό-μωβ ίζημα (4-χλωρο-1-ναφτόν). Το Reagent 4 περιέχει διάλυμα αντιχρώσης για τη διευκόλυνση της διάκρισης μεταξύ των θετικών στην

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

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

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- **Θετικά στην υπεροξειδάση στρογγυλά κύτταρα:** περιέχουν (κυανωπά)-μαύρα κοκκία και έχουν ανθρακί-γκρι κυτταρόπλασμα. 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.

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 = $120 / (120 + 80) = 0,6$
- Υπολογισμός θετικών στην υπεροξειδάση λευκών αιμοσφαιρίων = $0,6 \times 2 \text{ εκ./mL} = 1,2 \text{ εκ./mL}$

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.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα: CV_{intra} < 15%, CV_{inter} < 15%
Ποσοστιαία θετική συμφωνία: 88% - Ποσοστιαία αρνητική συμφωνία: 96%

ΦΥΛΑΞΗ / ΑΠΟΡΡΙΨΗ

- Το κιτ 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
- Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια μεταξύ 2°C-25°C
- Να μην καταψύχονται.
- Να προστατεύονται από το (ηλιακό) φως
- 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
- Τα αντιδραστήρια πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς για την απόρριψη των ιατροτεχνολογικών προϊόντων.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Συνιστάται η χρήση γαντιών.

Το Reagent 1 περιέχει μεθανόλη: Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα, Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης, Τοξικό σε επαφή με το δέρμα, Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής, Προκαλεί βλάβες στα όργανα.

Το Reagent 2 περιέχει H₂O₂: Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης, Επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής, Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη. Να χρησιμοποιείτε συσκευή προστασίας ματιών/προσώπου.

Το Reagent 3 περιέχει ProClin 950: Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες, Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.

Όλα τα δείγματα σπέρματος θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμώδη. Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν HIV ή ηπατίτιδα. Να χρησιμοποιείτε πάντα καινούργια ρύγχη πιπέτων για κάθε βήμα προς αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Να μην απορρίπτετε το προϊόν στο περιβάλλον.

Κάθε σοβαρό περιστατικό (όπως ορίζεται στον ευρωπαϊκό κανονισμό περί των in vitro διαγνωστικών ιατροτεχνολογικών προϊόντων 2017/746) θα πρέπει να αναφέρεται στη FertiPro NV και, κατά περίπτωση, στην αρμόδια αρχή του Ευρωπαϊκού κράτους μέλους της ΕΕ στο οποίο είναι εγκατεστημένος ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

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 leukocyte 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, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021
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. Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 63;1143.
8. 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.
9. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologica*; 35:271-278.
10. 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.

ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΠΕΛΑΤΩΝ-ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ








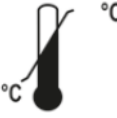








FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem / Belgium
Tel +32 (0)50 79 18 05
Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: www.fertipro.com
E-mail: info@fertipro.com



LEUCO_PLUS

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

Σύμβολα όπως ορίζονται στο ISO 15223-1			
	Αριθμός καταλόγου		Κωδικός παρτίδας
	Διατηρείτε το προϊόν μακριά από το ηλιακό φως		Παρασκευαστής
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Ημερομηνία λήξης
	Προϊόντα διάγνωσης in vitro		Όριο θερμοκρασίας
Σύμβολο όπως ορίζεται στην ΟΙΠ 2017/746			
	CE marking by Notified Body 2797		
Σύμβολο όπως ορίζεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008 [CLP]			
	GHS08 Σοβαρός κίνδυνος για την υγεία		GHS07 Κίνδυνος για την υγεία
	GHS02 Εύφλεκτο υγρό		GHS05: Διάβρωση/ερεθισμός του δέρματος
	GHS06 Οξεία τοξικότητα		