

LeucoScreen Plus

Kit istochimico semiquantitativo per la determinazione di leucociti perossidasi-positivi nel liquido seminale umano

ID documento: FP09 I111 R01 B.1

Aggiornamento: 22/12/2022

Per uso diagnostico in vitro

Reagente esclusivamente per uso professionale

INFORMAZIONI GENERALI

La maggior parte dell'eiaculato umano contiene leucociti, che nel liquido seminale si presentano prevalentemente sotto forma di granulociti perossidasi-positivi^{1,2,3,4}. L'eccessiva presenza di tali cellule (leucocitospermia) può indicare un'infezione del tratto riproduttivo. La leucocitospermia può essere anche associata a difetti del profilo seminale (riduzione della motilità e di integrità del DNA spermatico, aumento della viscosità dello sperma nonché perdita della funzionalità spermatica in seguito a stress ossidativo, e/o secrezione di citochine citotossiche da parte di tali leucociti)^{5,6}. Benché la leucocitospermia non sia un'indicazione assoluta di infertilità, questa condizione si osserva in media nel 10-20% di tutti gli uomini affetti da infertilità⁷.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la presenza di oltre un milione di leucociti perossidasi-positivi per ml di eiaculato si considera anomala ed è classificata come "leucocitospermia"⁸. Questa soglia è tuttavia in discussione, poiché per alcuni si tratta di un valore è eccessivamente esiguo, mentre per altri è eccessivamente elevato. In effetti, sono stati riportati⁷⁻⁹ livelli soglia da $0,2 \times 10^6$ a 2×10^6 .

Quando si supera la soglia di un milione di leucociti perossidasi-positivi per ml di eiaculato, si devono condurre test microbiologici al fine di indagare la presenza di un'infezione nelle ghiandole accessorie. La valutazione dei marker delle ghiandole accessorie può fornire utili informazioni aggiuntive sul corretto funzionamento dell'epididimo (EpiScreen Plus, FertiPro NV), delle vescichette seminali (Fructose Test, FertiPro NV) o della prostata. È importante notare che l'assenza di leucociti non esclude la possibilità di un'infezione nelle ghiandole accessorie.

SCOPO PREVISTO

LeucoScreen Plus è un kit semiquantitativo, non automatizzato, istochimico e diagnostico per la determinazione di leucociti perossidasi-positivi nel liquido seminale umano.

Il numero di test che possono essere svolti con il kit LeucoScreen Plus non è specificato; il kit è stato invece progettato per 40 giorni di analisi nel corso della vita del kit (possono essere preparate 20 soluzioni di lavoro che restano stabili per due giorni consecutivi).

MATERIALE INCLUSO NEL TEST

Reagente 1: 6 ml di soluzione substrato (4-CN in metanolo)

Reagente 2: 300 µl di perossido di idrogeno al 30%

Reagente 3: 22 ml di soluzione tampone

Reagente 4: 1,2 ml di soluzione di contrasto

Un certificato di analisi e la scheda dati di sicurezza sono disponibili su richiesta o possono essere scaricati dal nostro sito web (www.fertipro.com).

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Vetrini per microscopio, coprivetrini, provette (Eppendorf), pipette, microscopio in campo chiaro.

Nota: si raccomanda l'uso di un microscopio ottico e non di un microscopio a contrasto di fase, poiché quest'ultimo potrebbe generare difficoltà nell'interpretazione.

PRINCIPIO DEL TEST

Quando si esegue un tipico spermogramma, è molto difficile differenziare i leucociti da altri tipi di cellule rotonde nel campione seminale (ad esempio le cellule progenitrici degli spermatozoi¹⁰). LeucoScreen Plus sfrutta l'attività di perossidasi intrinseca di determinati leucociti e pertanto può essere impiegato per differenziare i leucociti perossidasi-positivi (ad es. i granulociti polimorfonucleati [PMN] e i macrofagi) da altri tipi di cellule rotonde in un campione di sperma umano.

In presenza del reagente 2 (H_2O_2), la mieloperossidasi nei granuli dei leucociti ossiderà il reagente 1 (4-CN) in un precipitato viola-bluastro (4-cloro-1-naftone). Il reagente 4 contiene una soluzione di contrasto che facilita la differenziazione tra le cellule rotonde perossidasi-positive e quelle perossidasi-negative.

METODO

Precedentemente al primo uso del kit LeucoScreen Plus, si raccomanda fortemente di seguire il programma di formazione e di guardare il video dimostrativo, entrambi disponibili sul nostro sito web. Il video è scaricabile anche scansionando il codice QR:



TIPI DI CAMPIONI

Il test deve essere eseguito su campioni di sperma umano appena raccolti che contengano almeno 1×10^6 cellule rotonde per ml.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Dovrebbero essere utilizzati contenitori standard per la raccolta del liquido seminale, tipicamente in polipropilene e testati per la sopravvivenza/motilità degli spermatozoi, quando il liquido seminale viene raccolto mediante masturbazione. I preservativi in plastica non tossica per gli spermatozoi devono essere usati quando la raccolta del liquido seminale mediante masturbazione è sconsigliata. Mantenere il contenitore di raccolta del liquido seminale a temperatura ambiente prima di aggiungere il campione per evitare significative variazioni di temperatura che potrebbero influire sugli spermatozoi. Il test deve essere svolto entro lo stesso giorno in cui viene raccolto il liquido seminale.

AVVERTENZE PRIMA DELL'USO

Non utilizzare il prodotto se, all'atto della consegna del kit, il sigillo dei flaconi è aperto o difettoso.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il reagente 1 deve contenere un fluido trasparente: non utilizzare il kit se il fluido ha assunto un colore giallo.

METODO

1. Contare il numero di cellule rotonde durante la determinazione della concentrazione spermatica nel corso dello spermogramma di routine. Calcolare e annotare la concentrazione totale di cellule rotonde in ml/ml: questo valore servirà per calcolare la concentrazione di leucociti perossidasi-positivi.

Quando la concentrazione di cellule rotonde supera 1×10^6 per ml, è consigliato il test LeucoScreen Plus.

2. Preparare la soluzione di lavoro: aggiungere i seguenti volumi a una provetta Eppendorf e mescolare accuratamente.

- 200 µl di reagente 1
- 5 µl di reagente 2
- 1 ml di reagente 3

Questa soluzione di lavoro è stabile per 48 ore a una temperatura di conservazione tra i 2 °C e gli 8 °C, al riparo dalla luce (solare).

3. Prelevare 10 µl del campione seminale e aggiungere 20 µl di soluzione di lavoro. Mescolare accuratamente.

4. Incubare per due minuti a temperatura ambiente **al buio**.

5. Trasferire 10 µl della miscela al centro di un vetrino da microscopio e aggiungere 10 µl di reagente 4. Mescolare accuratamente usando il bordo del coprivetrino.

6. Coprire con il coprivetrino.

7. Contare e classificare 200 cellule rotonde in totale usando un ingrandimento di 400x. Esaminare diversi campi microscopici (se possibile 20).

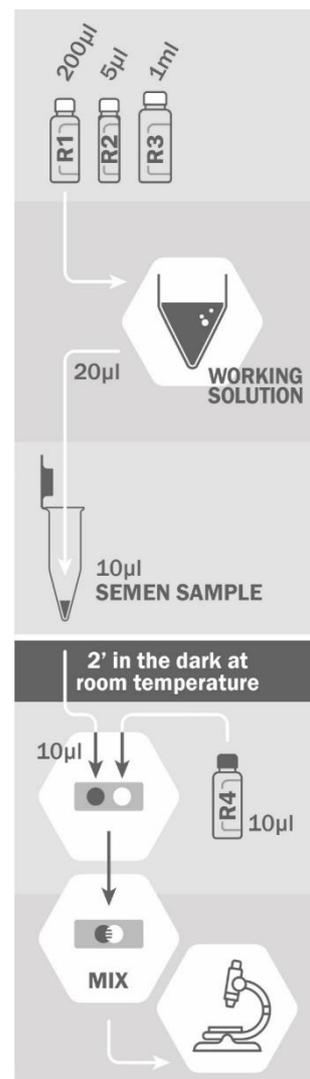
8. Dopo ogni singolo test, smaltire tutti i reagenti e i materiali utilizzati.

Nota: per facilitare la conta cellulare di alcuni campioni seminali potrebbe essere conveniente arricchire la concentrazione di cellule rotonde. Pertanto, centrifugare il campione per 15 minuti a 350 g, rimuovere parte del volume del campione seminale e far sospendere nuovamente il pellet.

In caso di concentrazione molto elevata di cellule rotonde (ossia oltre 20×10^6 per ml) si consiglia fortemente di diluire il campione in PBS o in FertiCult™ Flushing.

INTERPRETAZIONE

- Cellule rotonde perossidasi-positive: contengono granuli neri (bluastri) e un citoplasma grigio antracite. Quest'area antracite può coprire la cellula completamente o solo in parte.
- Cellule rotonde perossidasi-negative: rimangono non colorate oppure possono essere di colore rosa. I granuli osservati nelle cellule non colorate non sono contornati dal tipico color antracite visto nelle cellule positive.



CALCOLO DELLE CONCENTRAZIONE DI LEUCOCITI PEROSSIDASI-POSITIVI

- Calcolare la percentuale di cellule perossidasi-positive come segue:

$$\text{PERCENTUALE DI CELLULE ROTONDE PEROSSIDASI-POSITIVE} = \frac{\text{Numero di cellule rotonde POSITIVE}}{(\text{Numero di cellule rotonde POSITIVE} + \text{Numero di cellule rotonde NEGATIVE})}$$

- Ora calcolare la concentrazione di leucociti perossidasi-positivi nel campione seminale come segue:

$$\text{CONCENTRAZIONE (mil/ml)} = \text{percentuale di cellule positive} \times \text{la concentrazione totale di cellule rotonde}$$

Esempio:

- La concentrazione totale di cellule rotonde è di 2 mil/ml (determinata durante l'analisi della concentrazione degli spermatozoi)
- Con il test LeucoScreen Plus sono state trovate 120 cellule rotonde positive e 80 cellule rotonde negative
- Percentuale di cellule rotonde positive = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$
- Concentrazione di leucociti perossidasi-positivi = $0,6 \times 2 \text{ mil/ml} = 1,2 \text{ mil/ml}$

LIMITI DEL METODO

Questo test è di aiuto nella diagnosi dell'infertilità maschile e, come per altri test biologici, l'interpretazione dei risultati deve essere eseguita nell'ambito dei reperti clinici e dei dati anamnestici. Il test LeucoScreen Plus colora solo i leucociti perossidasi-positivi; altri tipi di leucociti (ad es. i linfociti e monociti) non vengono rilevati.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Ripetibilità e riproducibilità: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Percentuale di accordo positivo: 88%; percentuale di accordo negativo: 96%

CONSERVAZIONE/SMALTIMENTO

- Il kit è stabile per almeno 12 mesi dalla data di produzione (anche dopo l'apertura)
- Non utilizzare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto
- Conservare i reagenti tra 2 °C e 25 °C
- Non congelare
- Tenere lontano dalla luce (solare)
- I flaconi devono essere tenuti sempre ben chiusi
- La soluzione di lavoro può essere conservata fino a 48 ore a 2-8 °C, al riparo dalla luce (solare)
- Adatto al trasporto o all'esposizione a breve termine a temperature elevate (fino a 5 giorni a 37 °C).
- I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle norme locali per lo smaltimento dei dispositivi medici

PRECAUZIONI

Si consiglia l'uso di guanti.

Il reagente 1 contiene metanolo: liquido e vapori altamente infiammabili, tossico se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato, provoca danni agli organi.

Il reagente 2 contiene H₂O₂: nocivo se ingerito o inalato; provoca gravi lesioni oculari. Proteggere gli occhi/il viso.

Il reagente 3 contiene ProClin 950: provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari, può provocare una reazione allergica cutanea.

Tutti i campioni seminali devono essere considerati potenzialmente infettivi. Manipolare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere HIV o epatite. Per evitare contaminazione crociata, utilizzare sempre puntali per pipette nuovi per ciascun passaggio. Non gettare il prodotto nell'ambiente.

Nel caso si verifichi un incidente grave (ai sensi del "Regolamento europeo 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro"), occorre segnalarlo a FertiPro NV e, se del caso, all'autorità competente dello Stato membro dell'UE in cui risiede l'utente e/o il paziente.

BIBLIOGRAFIA

- Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 49(3): 497-504
- 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.
- 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.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021
- 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.
- 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.
- Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 63;1143.
- 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.
- Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologica*; 35:271-278.
- Johanisson 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.

ASSISTENZA TECNICA E CLIENTI



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem / Belgio
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

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

Simboli definiti in ISO 15223			
	Numero di catalogo		Codice del lotto
	Tenere lontano dalla luce (solare)		Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso		Data di scadenza
	Diagnostica in vitro		Limite di temperatura
Simbolo definito nel regolamento IVD 2017/746			
	Marchatura CE da parte dell'organismo notificato 2797		
Simbolo definito nel regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]			
	GHS08 Grave pericolo per la salute		GHS07 Pericolo per la salute
	GHS02 Liquido infiammabile		GHS05 Corrosione/irritazione cutanea
	GHS06 Tossicità acuta		