

LeucoScreen

Тест для определения содержания лейкоцитов в сперме

Документ №: FP09 I05 R01 B.13,

Дата издания: 05.09.2018 г.

Гистохимический полуколичественный набор для определения содержания пероксидаз-положительных белых клеток крови в сперме

ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоциты (белые клетки крови, БКК) содержатся в эякуляте большинства мужчин, причем преобладающим типом этих клеток являются пероксидаз-положительные гранулоциты^{1,2,3,4}. Присутствие избыточного количества этих клеток (лейкоцитоспермия) может свидетельствовать о наличии инфекции репродуктивного тракта. Лейкоцитоспермия также может быть связана с дефектами профиля спермы, такими как снижение объема эякулята, концентрации сперматозоидов и их подвижности, а также потерей функции спермы в результате окислительного стресса^{2,5} и/или секрецией цитотоксических цитокинов⁶. Хотя лейкоцитоспермия и не является абсолютным показателем бесплодия, данное состояние наблюдается в среднем у 10-20% всех бесплодных мужчин⁸.

При проведении типичного анализа спермы очень трудно дифференцировать белые клетки крови (лейкоциты) от других типов круглых клеток в образце спермы (например, клетки-прекурсоры сперматогенезы⁷). Относительно быстрый и недорогой метод дифференцирования пероксидаз-положительных белых клеток крови (лейкоциты) от других круглых клеток в образце спермы использует внутреннюю пероксидазную активность данных клеток⁷. Тест LeucoScreen основан на данном методе, и, таким образом, может быть использован для окрашивания пероксидаз-положительных белых клеток крови в образце спермы человека.

В соответствии с Всемирной организацией здравоохранения, присутствие более 1,0 млн пероксидаз-положительных белых клеток крови на 1 мл эякулята считается аномальным и обозначается как «лейкоцитоспермия»⁴. Тем не менее, данное пороговое значение в настоящее время обсуждается, поскольку некоторые исследования показали, что данное значение является слишком низким, в то время как другие – слишком высоким. Так, сообщалось о пороговом значении в 0.2×10^6 – 2×10^6 .

В случае, если сперма содержит более 1,0 млн пероксидаз-положительных белых клеток крови на 1 мл эякулята, рекомендуется провести дополнительное микробиологическое исследование для определения наличия инфекции придаточных желез. Оценка маркеров придаточных желез может дать дополнительную полезную информацию о надлежащем функционировании эпидидимиса (набор EpiScreen Plus (определение содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в сперме)), семенных пузырьков (набор Fructose Test (определение содержания фруктозы в сперме)) или простаты (набор Citric Acid Test (определение содержания лимонной кислоты в сперме)). Важно отметить, что отсутствие лейкоцитов в эякуляте не исключает наличие инфекции придаточных желез.

Число тестов, которое может быть проведено с помощью одного набора LeucoScreen, не приводится; вместо этого набор рассчитан на 20 дней анализа.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Реагент 1 – 20 мл красителя LeucoScreen (содержит бензидин, цианозин и метанол).
 - Реагент 2 – 1 мл 3% перекиси водорода.
- Сертификат анализа и паспорт безопасности доступны на сайте www.fertipro.com.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Микроскоп
- Покровные стекла
- Предметные стекла
- Пипетки

ПРИНЦИП ТЕСТА

Гранулы в полиморфноядерных БКК содержат пероксидазу. Пероксидаза катализирует перекись водорода в воду и свободные ионы кислорода, которые, в свою очередь, окисляют бензидин. Окисленный бензидин становится коричневым, тем самым окрашивая пероксидаз-положительные клетки в коричневый цвет. Реагент 1 также содержит красную контрастную жидкость для дифференцирования пероксидаз-положительных круглых клеток от пероксидаз-отрицательных круглых клеток.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- **Пероксидаз-положительные** круглые клетки окрашиваются в цвет от желтого до коричневого/коричнево-красного. Данные клетки являются полиморфноядерными лейкоцитами.
Примечание: положительные клетки окрашены полностью или частично, иногда они видны в качестве коричневых пятен
- **Пероксидаз-отрицательные** круглые клетки окрашены в розовый цвет. К данным клеткам относятся все остальные круглые клетки (напр., сперматиды, пероксидаз-отрицательные белые клетки крови).

ВЫБОР ОБРАЗЦА ДЛЯ АНАЛИЗА

Нативный сжиженный эякулят, содержащий более 1 млн/мл круглых клеток.

МЕТОД¹¹

1. Посчитайте число круглых клеток во время определения концентрации сперматозоидов при рутинном анализе спермы. Посчитайте и запишите общую концентрацию круглых клеток (млн/мл), поскольку она понадобится для расчета концентрации пероксидаз-положительных БКК. В случаях, когда концентрация круглых клеток превышает 1×10^6 /мл, проведите тест LeucoScreen.
2. Приготовьте рабочий раствор в вытяжном шкафу (Реагент 1 весьма токсичен): Добавьте 30 мкл Реагента 2 к 1 мл Реагента 1 и тщательно перемешайте. Этот рабочий раствор стабилен в течение одного дня.
3. Смешайте одну каплю (10 мкл) спермы с одной каплей (10 мкл) рабочего раствора, используя край покровного стекла. Тщательно перемешивайте в течение по крайней мере 1 минуты.
4. Подождите 1 минуту. Накройте смесь покровным стеклом, избегая крупных воздушных пузырьков. Образование маленьких воздушных пузырьков является нормальным явлением, вызванным пероксидазной реакцией. Чем выше концентрация пероксидаз-положительных клеток, тем больше будет образовываться пузырьков.
Примечание: при наличии избыточного образования пузырьков проанализируйте образец незамедлительно.
5. Через 2 минуты проанализируйте не менее 20 отдельных микроскопных полей и подсчитайте число пероксидаз-положительных круглых клеток и число

пероксидаз-отрицательных круглых клеток (см. раздел «Интерпретация результатов»). Используйте 400-кратное увеличение.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БЕЛЫХ КЛЕТОК КРОВИ

1. Подсчитайте долю пероксидаз-положительных клеток, как указано ниже:

Доля пероксидаз-положительных клеток =

$$\frac{\text{число пероксидаз - положительных круглых клеток}}{\text{число пероксидаз - положительных круглых клеток} + \text{число пероксидаз - отрицательных круглых клеток}}$$

2. Рассчитайте концентрацию пероксидаз-положительных белых клеток крови в образце спермы, как указано ниже:

Концентрация (млн/мл) =

Доля пероксидаз-положительных клеток x Общая концентрация круглых клеток

Пример:

- Общая концентрация круглых клеток составляет 2 млн/мл (определена во время рутинного анализа концентрации сперматозоидов)
- Во время проведения теста LeucoScreen было выявлено 120 положительных круглых клеток и 80 отрицательных круглых клеток
- Доля пероксидаз-положительных клеток = $\frac{120}{120 + 80} = 0,6$
- Концентрация пероксидаз-положительных белых клеток крови = $0,6 \times 2 \text{ млн/мл} = 1,2 \text{ млн/мл}$

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Хранить реагенты при температуре 2-25 °С в защищенном от света месте. Набор годен к использованию в течение 12 месяцев с даты производства (даже после вскрытия).

Набор можно транспортировать или хранить в течение короткого периода при повышенных температурах (до 5 суток при 37 °С). Не замораживать. Не использовать после истечения срока годности, указанного на упаковке.

Рабочий раствор может храниться до 24 ч в темноте при комнатной температуре.

ПРИМЕЧАНИЯ

Образование осадка в Реагенте 1 является нормальным. Для удаления осадка отфильтруйте Реагент 1 через фильтровальную бумагу.

В случае, если общая концентрация круглых клеток в образце спермы не была определена (п.1 раздела «Метод» не был выполнен, что не рекомендуется), возможно рассчитать концентрацию пероксидаз-положительных лейкоцитов на основе числа таких клеток, подсчитанных на 1 микроскопное поле. В этом случае важно учесть точный объем исследуемой смеси спермы в одном микроскопном поле. Данный объем, выраженный в мкл, рассчитывается следующим образом:

- Измерьте диаметр 1 микроскопного поля с помощью микрометра (микрометрического слайда) и рассчитайте радиус:

$$r \text{ (радиус в мм)} = \frac{\text{диаметр (в мкм)}}{2} / 1000$$

- Рассчитайте глубину образца (=расстояние между предметным и покровным стеклами)

$$D \text{ (глубина в мм)} = \frac{\text{Объем смеси спермы с реагентом (20 мкл)}}{\text{Длина (мм)} \times \text{ширина (мм)} \text{ покровного стекла}}$$

- V (объем в одном микроскопном поле в мкл) = $D \times r^2 \times 3.14$
Обследуйте по меньшей мере 20 различных микроскопных полей и подсчитайте суммарное число пероксидаз-положительных круглых клеток в них. Проведите следующие расчеты:
- A = среднее число пероксидаз-положительных клеток на 1 микроскопное поле
- N = число пероксидаз-положительных клеток на смесь образца спермы с реагентом (клеток/мл) = $\frac{A}{V} \times 10^3$
- Концентрация пероксидаз-положительных лейкоцитов в нативном (исходном) образце спермы (клеток/мл) = $2 \times N$

Пример:

- Диаметр микроскопного поля = 250 мкм $\rightarrow r = 0.125$ мм
- Покровное стекло = 24x40 мм $\rightarrow D = [20/(24 \times 40)] = 0.0208$ мм
- $V = 0.0208 \times 0.125^2 \times 3.14 = 0.00102$ мкл
- 100 пероксидаз-положительных лейкоцитов подсчитано в 20 микроскопных полях $\rightarrow A = 5$
- $N = 5/0.00102 \times 10^3 = 4\,900\,000$ клеток/мл
- Концентрация пероксидаз-положительных лейкоцитов в нативном образце спермы (клеток/мл) = $2 \times 4\,900\,000 = 9\,800\,000$ клеток/мл.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест помогает в диагностике мужского бесплодия, и, как и для иных биологических тестов, интерпретация его результатов должна быть проведена в рамках клинических результатов и анамнеза.

Тест LeucoScreen окрашивает только пероксидаз-положительные белые клетки крови. Другие типы белых клеток крови (напр., лимфоциты и моноциты) не могут быть определены.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Чувствительность и специфичность пероксидазного окрашивания при лейкоцитоспермии составляет 90% по сравнению с иммуногистологическим тестом¹². Пограничное (пороговое) значение для пероксидазного окрашивания составляет 1 млн БКК/мл, в то время как для иммуногистологического теста оно составляет 2 млн БКК/мл.

Набор LeucoScreen позволяет отличить пероксидаз-положительные и пероксидаз-отрицательные круглые клетки с внутритестовым и межтестовым коэффициентом вариации (CV) менее 10%.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Все образцы спермы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита.

Реагент 1 очень токсичен при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании. Несет риск непоправимого вреда. Используйте защитную одежду и перчатки. При попадании на одежду незамедлительно снимите ее. Работайте в вытяжном шкафу. При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

Реагент 2: агрессивное (едкое) вещество, вызывает ожоги. При попадании на кожу тщательно промыть водой с мылом. Используйте защиту для глаз и лица.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

FertiPro N.V., Бельгия

www.fertipro.com

ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ:

ООО «Селл Диагностик»

Адрес для почтовых отправлений: 220020 Минск, а/я 5

Тел.: +375 29 391 16 90

Факс: +375 17 395 88 09

Е-mail: cell.diagnost@gmail.com

www.celldiagnostic.by



СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-36.
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*, 13:433-51.
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*, 5:639-44.
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*, 41:183-7.
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*, 47:460-5.
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. *Andrologica*; 35:271-278.
11. Endtz, A.W. (1972) Een methode om het vochtige urinesediment en het vochtige menselijke sperma rechtstreeks te kleuren. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 116(17): 681-5.
12. Politch, J.A., et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60(2): 372-5.