

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор
ООО «ФерроТраст»



В.В. Шестопалов
2020 г.

М.П.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор направления
«Клинические исследования»
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»



Я.Э. Новикова
2020 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

медицинского изделия для диагностики in vitro

«Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных
лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen Plus»,
производства FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Бельгия

№ ИНОКИ 403/2019

**Instruction for use of the medical device:
In vitro diagnostic kit for the determination
of peroxidase-positive leucocytes in human
semen - LeucoScreen Plus.**

VOOR EENSLUIDEND AFSCHRIFT

Gezien door ondergetekende Notaris Roel Mondelaers
te Aalter voor legalisatie van bovenstaande
handtekening(en) in zijn aanwezigheid geplaatst
van Sven Comhaire



APPROVE

FertiPro N.V., Belgium

President
(position)
Sven Comhaire
(name)
(signature)

"12" 03 2020
("day" month (numerals))

Stamp



Instructions for use

LeucoScreen Plus

In vitro diagnostic kit for the determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen (in the text below referred to as LeucoScreen Plus)
Ref. doc: FP09 1111 R01 A.3_Rus Update: 04/02/2020
For in vitro diagnostic use only - Reagent for professional use only

IVD

INTENDED USE

In vitro diagnostic kit for the determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen - LeucoScreen Plus is intended to be used for a semi-quantitative histochemical determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen.

INTRODUCTION

Most human ejaculates contain leucocytes and the predominant form of leucocytes in human semen are peroxidase-positive granulocytes^{1,2,3,4}. Excessive presence of these cells (leucocytospermia) may indicate the existence of reproductive tract infection. Leucocytospermia may also be associated with defects in the semen profile. This includes reductions in the volume of the ejaculate, decreased sperm concentration and sperm motility, as well as loss of sperm function as a result of oxidative stress^{5,6} and/or secretion of cytotoxic cytokines⁶. Although leucocytospermia is not an absolute indication of infertility, this condition is observed on average in 10 to 20% of all infertile men⁸.

When a typical semen analysis is performed, it is very difficult to differentiate white blood cells from other types of round cells in the semen sample (for example spermatogenic precursor cells⁷). A relatively rapid and inexpensive method of differentiating peroxidase positive white blood cells from other round cells in a semen sample makes use of the intrinsic peroxidase activity of these cells⁷. LeucoScreen Plus is, just like LeucoScreen, based on this technique and can therefore be used to stain the peroxidase positive white blood cells in a human semen sample.

According to the World Health Organization, the presence of more than one million peroxidase positive white blood cells (WBC) per ml ejaculate is considered abnormal and is labelled as "leucocytospermia"^{9,10}. However, this threshold is under debate, as some have found this value too low and others too high. Indeed, threshold levels from 0.2×10^6 – 2×10^6 have been reported⁸⁻¹⁰.

When the threshold of one million peroxidase positive WBC per ml ejaculate is exceeded, microbiologic tests should be performed to investigate if there is an accessory gland infection. Assessment of accessory gland markers can provide additional useful information about the proper functioning of the epididymis (EpiScreen Plus, FertiPro NV, Belgium), seminal vesicles (Fructose Test – 96 Tests, FertiPro NV, Belgium) or prostate (Citric Acid Test – 96 Tests, FertiPro NV, Belgium). Importantly, the absence of leucocytes does not exclude the possibility of an accessory gland infection.

FIELD OF APPLICATION

Clinical laboratory diagnostic

INDICATIONS FOR USE

LeucoScreen Plus is intended to help in the diagnosis and treatment of male infertility.

CONTRINDICATIONS FOR USE

There are no contraindications for use for the LeucoScreen Plus kit.

INTENDED USER

LeucoScreen Plus is an IVD for professional use only and is intended to be used in healthcare institutions e.g. medical laboratories, specialized laboratories performing fertilization techniques, including IVF, ICSI and sperm preparation / analysis. The intended users are IVF professionals (lab technicians, andrologists, embryologists or medical doctors).

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

- Reagent 1: 1x6ml Substrate solution (contains 4CN, methanol)
- Reagent 2: 1x300µl Hydrogen peroxide (contains Hydrogen peroxide 30%)
- Reagent 3: 1x22ml Buffer solution (contains PBS, ProClin 950)
- Reagent 4: 1x1.2ml Counter stain solution (contains PBS, Ponceau S solution)

A certificate of analysis and the MSDS are available on our website (www.fertipro.com).

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT, BUT NEEDED FOR WORK WITH THE DEVICE

Microscope slides, cover glasses, test tubes (eppendorf), pipettes, bright field microscope.

SAMPLES ANALYZED

1. SPECIMEN TYPE

The test should be performed on fresh human semen samples containing more than 1×10^6 round cells per ml.

2. PROCEDURE FOR OBTAINING ANALYZED BIOLOGICAL MATERIAL

Semen collection by masturbation is preferred. Semen sample should be ejaculated into a clean, wide-mouthed container made of glass or plastic, from a batch that has been confirmed to be non-toxic for spermatozoa⁴.

3. CONDITIONS OF STORAGE OF ANALYZED SAMPLES OF BIOLOGICAL MATERIAL

It is recommended to perform the test at the same day of ejaculation, provided that samples are stored at 2-8°C.

4. SAMPLE COLLECTION, PROCESSING AND STORAGE

Semen collection should occur after a minimum of 2 days and a maximum of 7 days of sexual abstinence by masturbation⁴. The test should be performed within 1 day of ejaculation. Until testing is performed, the sample should be stored at 2-8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Peroxidase, present in the granules of certain leucocytes, oxidizes 4-chloro-1-naphthol (4CN) to a bluish-purple 4-chloro-1-naphthol precipitate, utilizing H_2O_2 as the oxidant. Reagent 4 contains a counter stain solution to facilitate the differentiation between peroxidase-positive round cells and peroxidase-negative round cells.

THE NUMBER OF SAMPLES ANALYSED

Kit has been designed for a maximum of 120 analyses. The working solution can be used for 22 x 2 consecutive days of analysis, with a maximum of 60 analyses per test day and a total maximum of 120 analyses over all test days.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In an independent validation study, 44 samples (containing > 1 mill/ml round cells) were analyzed by different operators with LeucoScreen and LeucoScreen Plus. Performance characteristics:

1. Range of the determination concentration of substance: no limitation on the minimum or maximum concentration of peroxidase-positive round cells that can be measured
2. Accuracy: Both kits provided comparable results based on Passing Bablok analysis.
3. Precision: Both kits can distinguish between peroxidase-positive and -negative round cells with comparable precision (LeucoScreen Plus: CV_{intra}: 12%; CV_{inter}: 10%)
4. Threshold value: a normal semen sample should not contain more than 1×10^6 peroxidase-positive white blood cells per ml
5. Diagnostic sensitivity: 88%, diagnostic specificity: 96%, when compared to LeucoScreen.

ANALYTICAL CHARACTERISTICS

1. Measurement range: no limitation on the minimum or maximum concentration of peroxidase-positive round cells that can be measured
2. Intra-assay CV < 15% (Repeatability)
3. Inter-assay CV < 15% (Reproducibility)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Use of gloves is advised. Reagent 1 contains methanol: avoid inhalation of vapors. Reagent 2 contains H_2O_2 : corrosive, causes burns. After contact with skin wash immediately with water and soap. Wear eye / face protection, medical gloves. All semen samples should be considered potentially infectious. Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis. Always use fresh pipette tips for each step to avoid cross-contamination. Do not discard product into the environment.

PRE-USE CHECK

Reagent 1 should contain a clear fluid, do not use the kit if the fluid has turned yellow.

CARRYING OUT THE ANALYSIS

We recommend to watch our demonstration video (download via link on our website, or scan barcode):



1. Count the number of round cells whilst determining the sperm concentration during routine semen analysis. Calculate and write down the total concentration of round cells in mill/mL, as this will be needed for the calculation of the concentration peroxidase-positive white blood cells.
2. When round cells concentration exceeds 1×10^6 per ml, the LeucoScreen Plus is indicated.

3. Prepare working solution: Add 200 µl Reagent 1, 5 µl Reagent 2 and 1 ml Reagent 3 to an Eppendorf tube and mix thoroughly. This working solution is stable for 48 hours when stored between 2-8°C, protected from (sun)light.
4. Take 10 µl of the semen sample and add 20 µl of working solution. Mix thoroughly.
5. Incubate for two minutes at room temperature in the dark.
6. Transfer 10 µl of the mix to the middle of a microscope glass and add 10 µl of Reagent 4. Mix thoroughly using the edge of the cover slip.
7. Cover with the cover slip
8. Count and classify a total of 200 round cells using a magnification of 400x. Scan different microscopic fields (preferably 20).

Note: In some semen samples, you might prefer to enrich the round cell concentration to facilitate cell counting. Therefore, centrifuge the sample for 15 minutes at 350g and resuspend the pellet.

In case of very high concentration of round cells, it is also possible to dilute the sample in FertiCult Flushing medium.

INTERPRETATION

- **Peroxidase positive round cells:** contain (bluish-)black granules and have an anthracite-grey cytoplasm. This anthracite area can cover the complete cell or only part of it.
- **Peroxidase negative round cells:** remain unstained or can be pink-colored. Granules seen in unstained cells are not surrounded by the typical anthracite-grey color seen in positive cells.

CALCULATION OF THE CONCENTRATION OF PEROXIDASE-POSITIVE WHITE BLOOD CELLS

- Calculate the proportion of peroxidase-positive cells as follows:

PROPORTION POSITIVE ROUND CELLS =

$$\frac{\text{Number of POSITIVE round cells}}{(\text{Number of POSITIVE round cells} + \text{Number of NEGATIVE round cells})}$$

- Now, calculate the concentration of peroxidase-positive white blood cells in the semen sample as follows:

CONCENTRATION (mill/mL) =

Proportion positive round cells x total concentration of round cells

Example:

- Total concentration of round cells is 2 mill/mL (determined during sperm concentration analysis)
- With the LeucoScreen Plus test, 120 round cells are found positive and 80 round cells are found negative
- Proportion positive round cells = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Concentration of peroxidase-positive white blood cells = $0.6 \times 2 \text{ mill/mL} = 1.2 \text{ mill/mL}$

EVALUATION OF RESULTS

The results should be evaluated taking into account all clinical and laboratory findings related to the sperm sample. According to the World Health Organization, the presence of more than 1×10^6 peroxidase positive white blood cells per ml ejaculate is considered abnormal and is labelled as "leucocytospermia, values below 1×10^6 peroxidase positive white blood cells per ml ejaculate should be considered as normal.

CONDITIONS OF STORAGE, TRANSPORTATION AND OPERATION OF THE DEVICE

Store reagents between 2°C-25°C. Suitable for transport or short-term storage at elevated temperatures (up to 5 days at 37°C). Do not freeze. Protect from (sun) light. The kit is stable for at least 12 months after production date (even after opening), do not use after expiry date mentioned on the product label. The bottles must be kept tightly closed at all times. The working solution can be stored up to 48 hours at 2-8°C, protected from (sun) light.

Products that are stored with noncompliance of the temperature limit, must not be used.

LIMITATIONS OF THE METHOD

This test is an aid in the diagnosis of male infertility and, as for other biological tests, interpretation of the results must be performed within the framework of clinical findings and data of history taking. The LeucoScreen Plus only stains peroxidase-positive WBC, other types of WBC (e.g. lymphocytes and monocytes) are not detected. On the other hand, it has been reported that the predominant form of leucocytes in human semen samples are peroxidase-positive leucocytes.

DISPOSAL

When a waste of Class A or B is formed during the use of the kit in the clinical diagnostic laboratory, this waste should be classified and disposed in accordance

with the requirements of SanPin 2.1.7.2790-10 "Sanitary – epidemiological requirements to the treatment of medical waste".

A kit's used, expired and unused reagents belong to class B and disposal should occur in accordance with the requirements of SanPin 2.1.7.2790-10.

The packaging of the reagents kit (box) after intended use belongs to class A waste and should be disposed as household waste.

SAFEGUARDS OBLIGATIONS

The manufacturer guarantees that the products are in accordance with the requirements declared by the manufacturer, if abide by the rules of use, transportation and storage.

If there are questions regarding the quality of a medical device, you must contact the authorized representative on Russian Federation territory: OOO "FerroTrust", Russia, Ekaterinburg, Karla Marks str., d. 8 of. 411.

PACKING

LeucoScreen Plus kits are packed in a cardboard box.

PRODUCT ORDER CODES

REF LEUCO_PLUS

MARKING



For in vitro diagnostic use



CE marking of conformity



Catalogue number



Batch number



Consult instructions for use



Date of manufacture



Manufacturer



Use-by date



Temperature limit



Protect from sunlight



Symbol of a voluntary certification



Oxidising



Flammable



Corrosive



Harmful/irritant



Respiratory hazard/serious health hazard



Acute toxicity

BIBLIOGRAPHY

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. Andrologica; 35:271-278.

MANUFACTURER



FertiPro N.V., Industriepark Noord 32,
8730 Beernem, Belgium.
URL: <http://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com

AUTHORIZED REPRESENTATIVE IN RUSSIA

FerroTrust LTD, Karl Marks str., D. 8
office 411, 620026, Ekaterinburg,
Russia, tel.: 8(343) 269-40-45, 261-60-29,
e-mail: frust96@mail.ru



Инструкция по применению на медицинское изделие:

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen Plus.

КОПИЯ ВЕРНА

Штамп: Нижеподписавшийся Нотариус города
Алтер Розль Монделаерс настоящим
свидетельствует, что подпись,
поставленная в его присутствии,
принадлежит Свену Комхаирэ

[Круглая печать: Розль Монделаерс, Нотариус *
9880 Алтер]

/подпись/

УТВЕРЖДАЮ

FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Бельгия

Президент
(должность)

Свен Комхаирэ
(имя)

/подпись/
(подпись)

«12» 03. 2020 года
("день" месяц (цифрами))

Штамп:

FertiPro nv
Индустриепарк 32
В-8730 Бирнем/Бельгия
идентификационный номер
плательщика НДС: BE 0448 767 035

Печать

FertiPro 
ЕРМАКОВА Н. А. 

Инструкция по применению

LeucoScreen Plus

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека (далее по тесту - LeucoScreen Plus)

Ссылка на документ: FP09 I111 R01 A.3_Rus Update: 04/02/2020

Только для использования для диагностики in vitro - Реагенты только для профессионального использования

IVD

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПО НАЗНАЧЕНИЮ

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen Plus предназначен для количественного гистохимического определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека.

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть эякулятов человека содержит лейкоциты, и преобладающей формой лейкоцитов в образцах спермы человека являются пероксидаза-положительные гранулоциты^{1,2,3,4}. Чрезмерное присутствие этих клеток (лейкоцитоспермия) может указывать на существование инфекции половых путей. Лейкоцитоспермия также может быть связана с дефектами профиля спермы. Сюда входит уменьшение объема эякулята, снижение концентрации сперматозоидов и их подвижности, а также утрата функции спермы в результате оксидативного стресса^{2,5} и/или секреции цитотоксических цитокинов⁶. Несмотря на то, что лейкоцитоспермия не является абсолютным показателем бесплодия, это состояние наблюдается в среднем у 10-20% всех бесплодных мужчин⁸.

При выполнении стандартного анализа спермы крайне сложно дифференцировать белые кровяные клетки от прочих типов круглых клеток в образце спермы (например, сперматогенные клетки-предшественники⁷). Относительно быстрый и недорогой способ дифференцировать пероксидаза-положительные белые кровяные клетки от прочих круглых клеток в образце спермы использует естественную пероксидазную активность этих клеток⁷. LeucoScreen Plus, как и LeucoScreen, основан на этой технике и, следовательно, может использоваться для окрашивания пероксидаза-положительных белых кровяных клеток в образцах человеческой спермы.

По данным Всемирной организации здравоохранения наличие более чем одного миллиона пероксидаза-положительных белых кровяных клеток (БКК) на мл эякулята считается аномальным и обозначается как «лейкоцитоспермия»⁴. Однако этот порог находится под вопросом, так как некоторые считают такое значение слишком низким, другие - слишком высоким. В действительности имеются данные о пороговых значениях в диапазоне от $0,2 \times 10^6$ до 2×10^6 ⁸⁻¹⁰.

Если пороговое значение в миллион пероксидаза-положительных БКК на мл эякулята превышен, должны быть проведены микробиологические тесты с целью выявления инфекций придаточных желез. Оценка маркеров придаточной железы может дать дополнительные полезные данные о важной работе эпидидимиса (EpiScreen Plus, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Бельгия), семенных пузырьков (Fructose Test - 96 Tests, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Бельгия) или простаты (Citric Acid Test - 96 Tests, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Бельгия). Важно отметить, что отсутствие лейкоцитов не исключает возможности инфекции придаточной железы.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

LeucoScreen Plus предназначен для помощи в диагностировании и лечении мужского бесплодия.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний к применению набора LeucoScreen Plus нет.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

LeucoScreen Plus - это набор для диагностики in vitro исключительно для профессионального использования, предназначенный для использования учреждениями здравоохранения, напр., медицинскими лабораториями, специализированными лабораториями, применяющими различные техники плодотворения, включая ЭКО, ИКСИ и подготовку / анализ спермы. Предполагаемые пользователи - это профессионалы в области ВРТ, лабораторные техники, андрологи, эмбриологи или врачи).

МАТЕРИАЛЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Реагент 1: 1х6мл Раствор субстрата (содержит 4CN, метанол)
- Реагент 2: 1х300мл Перекись водорода (содержит 30% перекись водорода)
- Реагент 3: 1х22мл Буферный раствор (содержит фосфатно-солевой буфер, ProClin 950)

- Реагент 4: 1х1,2мл Контр-окрашивающий раствор (содержит фосфатно-солевой буфер, раствор Понсо S)

Протокол анализа и паспорт безопасности представлены на нашем интернет-сайте (www.fertipro.com).

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР, НО НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИЗДЕЛИЕМ

Предметные стекла, покровные стекла, пробирки (Эппендорф), пипетки, светопольный микроскоп.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

1. ТИП ОБРАЗЦА

Тест должен проводиться на свежих образцах спермы человека, содержащих более 1×10^6 круглых клеток на мл.

2. ПРОЦЕДУРА СБОРА АНАЛИЗИРУЕМОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Предпочтительным является сбор спермы путём мастурбации. Образец спермы должен быть эякулирован в чистую ёмкость с широким горлышком, изготовленную из стекла или пластика, из лота, который был подтверждён как нетоксичный для сперматозоидов⁴.

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Рекомендуется проводить тест в день эякуляции, при условии, что образцы хранятся при температуре 2-8°C.

4. СБОР, ОБРАБОТКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сбор спермы должен происходить не ранее чем через 2 дня и не позднее чем через 7 дней полового воздержания путём мастурбации⁴. Тест должен быть выполнен в день сбора спермы. До проведения испытаний образец следует хранить при температуре 2-8°C.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Пероксидаза, присутствующая в гранулах некоторых лейкоцитов, окисляет 4-хлор-1-нафтол (4CN) до сине-фиолетового осадка 4-хлор-1-нафтона, используя H_2O_2 как окислитель. Реагент 4, содержит контр-окрашивающий раствор для облегчения дифференциации между пероксидаза-положительными и пероксидаза-отрицательными круглыми клетками.

КОЛИЧЕСТВО АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Набор был разработан для 120 анализов максимум. Рабочий раствор может использоваться для 22 x 2 последовательных дней анализа для максимума 60 анализов за один день тестов и общим количеством анализов за все дни тестов равным 120.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

В независимом валидационном исследовании разными лаборантами были проанализированы 44 образца (содержащих > 1 миллиона круглых клеток на мл) с использованием LeucoScreen и LeucoScreen Plus.

Рабочие характеристики:

- Диапазон определения концентрации вещества: ограничений по минимальной или максимальной концентрациям пероксидаза-положительных круглых клеток, которые могут быть измерены, нет
- Точность:** Оба набора дали сравнимые результаты по анализу Пассинга-Бэблока.
- Прецизионность:** Оба набора могут дифференцировать пероксидаза-положительные и -отрицательные круглые клетки со сравнимой степенью достоверности (LeucoScreen Plus: CV_{inter} : 12%; CV_{inter} : 10%)
- Пороговое значение: нормальный образец спермы не должен содержать более 1×10^6 пероксидаза-положительных лейкоцитов /мл.
- Диагностическая чувствительность:** 88%, **диагностическая специфичность:** 96%, по сравнению с LeucoScreen.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Диапазон измерений: ограничений по минимальной или максимальной концентрациям пероксидаза-положительных круглых клеток, которые могут быть измерены, нет
- Внутрианалитический коэффициент вариации <15% (Повторяемость)
- Межаналитический коэффициент вариации <15% (Воспроизводимость)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Рекомендуется использование перчаток. Реагент 1 содержит метанол: избегайте вдыхания паров. Реагент 2 содержит H_2O_2 : коррозионное вещество, вызывает ожоги. После контакта с кожей немедленно промойте этот участок водой и мылом. Надевайте защитные очки / маску, медицинские перчатки. Все образцы спермы считаются потенциально заразными. Со всеми образцами

Перевод с английского языка на русский язык

дуют обращаться так, как если бы через них может передаваться ВИЧ или гепатит. Всегда используйте свежие наконечники пипеток для предотвращения перекрестной контаминации. Не выбрасывайте продукт в окружающую среду.

ПРОВЕРКА ПЕРЕД НАЧАЛОМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Реагент 1 должен содержать прозрачную жидкость, не используйте набор, если жидкость стала желтой.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Мы рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачайте по ссылке с нашего интернет-сайта или просканируйте QR-код):



Посчитайте количество круглых клеток при определении концентрации сперматозоидов в течение стандартного анализа спермы. Рассчитайте и запишите общую концентрацию круглых клеток в миллионах на миллилитр, так как это понадобится для расчёта концентрации пероксидаза-положительных белых кровяных клеток.

LeucoScreen Plus показан, если концентрация круглых клеток превышает 1×10^6 на мл.

Подготовьте рабочий раствор: Добавьте Реагента 1 - 200 мкл, Реагента 2 - 1 мкл и Реагента 3 - 1 мл в пробирку Эппендорф и тщательно перемешайте. Этот рабочий раствор стабилен в течение 48 часов, если хранить его при температуре 2-8°C в защищённом от (солнечного) света месте.

Возьмите 10 мкл образца спермы и добавьте 20 мкл рабочего раствора. Тщательно перемешайте.

Выдерживайте в течение двух минут при комнатной температуре в темноте.

Поместите 10 мкл смеси в середину предметного стекла микроскопа и добавьте 10 мкл Реагента 4. Тщательно перемешайте краем покровного стекла.

Накройте покровным стеклом.

Подсчитайте и классифицируйте круглые клетки общим количеством 200 штук при 400-кратном увеличении. Просканируйте различные поля зрения микроскопа (желательно 20).

Примечание: в случае некоторых образцов спермы вы, возможно, посчитаете нужным увеличить концентрацию круглых клеток для облегчения подсчета. Для этого центрифугируйте образец в течение 15 минут при 350g и ресуспендируйте осадок.

В случае очень высокой концентрации круглых клеток также возможно привести образец в среде FertiCult Flushing.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Пероксидаза-положительные круглые клетки: содержат (сине-)черные гранулы, и их цитоплазма антрацитово-серая. Антрацитово-серая область может покрывать всю клетку или ее часть.

Пероксидаза-отрицательные круглые клетки: остаются неокрашенными или могут быть окрашены в розовый. Гранулы, которые видны в неокрашенных клетках, не окружены типичным антрацитово-серым цветом, наблюдаемым в положительных клетках.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗА-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БЕЛЫХ КРОВЯНЫХ КЛЕТОК

Рассчитайте пропорцию пероксидаза-положительных клеток по следующей формуле:

ПРОПОРЦИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КРУГЛЫХ КЛЕТОК =

$$\frac{\text{Количество ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ круглых клеток}}{(\text{Кол-во ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ круглых клеток} + \text{Кол-во ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ круглых клеток})}$$

Теперь рассчитайте концентрацию пероксидаза-положительных белых кровяных клеток в образце спермы по следующей формуле:

КОНЦЕНТРАЦИЯ (млн/мл) =

Пропорция положительных круглых клеток x общая концентрация круглых клеток

Пример:

- Общая концентрация круглых клеток - 2 млн/мл (определена в ходе анализа на концентрацию сперматозоидов)
- При помощи набора LeucoScreen Plus 120 круглых клеток идентифицированы как положительные и 80 - как отрицательные
- Пропорция положительных круглых клеток = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$
- Концентрация пероксидаза-положительных белых кровяных клеток = $0,6 \times 2 \text{ млн/мл} = 1,2 \text{ млн/мл}$

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты должны оцениваться с учётом всех клинических и лабораторных данных, связанных с образцом спермы. По данным Всемирной организации здравоохранения, наличие более 1×10^6

пероксидаза - положительных лейкоцитов на мл эякулята считается ненормальным и отмечается как «лейкоцитоспермия», значения ниже 1×10^6 пероксидаза - положительных лейкоцитов на мл эякулята следует считать нормальным.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЯ

Храните реагенты при температуре 2°C-25°C. Возможна транспортировка или краткосрочное хранение при повышенной температуре (до 5 дней при 37°C). Не подвергайте заморозке. Храните в защищённом от (солнечного) света месте. Набор стабилен в течение не менее 12 месяцев с даты производства (даже после вскрытия). Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке. Всегда держите флаконы плотно закрытыми. Рабочий раствор можно хранить до 48 часов при 2-8°C в защищённом от (солнечного) света месте.

Изделия, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный тест является вспомогательным инструментом при диагностировании мужского бесплодия, и, как и в случае с другими биологическими тестами, интерпретация результатов должна осуществляться в рамках клинической картины и данных сбора анамнеза. LeucoScreen Plus окрашивает только пероксидаза-положительные БКК, прочие типы БКК (напр., лимфоциты и моноциты) им не обнаруживаются. С другой стороны, имеются данные о том, что преобладающей формой лейкоцитов в образцах спермы человека являются пероксидаза-положительные лейкоциты.

УТИЛИЗАЦИЯ

При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно - эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами".

После использования набора, просроченные и неиспользованные реагенты относятся к классу Б и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Упаковка набора реагентов (коробки) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется вместе с бытовыми отходами.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Изготовитель гарантирует, что продукция соответствует требованиям, заявленным изготовителем, при условии соблюдения правил использования, транспортировки и хранения.

При возникновении вопросов по качеству медицинского изделия следует обращаться к уполномоченному представителю на территории Российской Федерации: ООО «ФерроТраст», Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 8 оф. 411.

УПАКОВКА

Наборы LeucoScreen Plus упакованы в картонные коробки.

КОДЫ ЗАКАЗА ПРОДУКЦИИ



LEUCO_PLUS

МАРКИРОВКА



Для диагностики in vitro



Маркировка соответствия нормам ЕС



Номер по каталогу



Код партии



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изготовления



Изготовитель



Использовать до...



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Символ добровольной сертификации в РФ



Окислитель



Легковоспламеняющаяся жидкость



Едкое вещество



Опасное/раздражающее вещество



Опасность для органов дыхания/серьезная угроза здоровью



Острая токсичность

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Волфф Х., Андерсон Д.Дж. (1988) Иммуногистологическая категоризация и квантификация субпопуляции лейкоцитов в человеческой сперме. Фертильность и стерильность, 49(3): 497-504
2. Эйткин Р.Дж., Уэст К.М. (1990) Анализ соотношения между продукцией активных форм кислорода и проникновением лейкоцитов во фракции человеческой спермы, разделенные на градиенты плотности Percoll. Международный журнал андрологии, 13 (6):433-51.
3. Барратт К.Л.Р., Болтон А.Э., Кук И.Д. (1990) Функциональная значимость белых кровяных телец в мужских и женских половых путях. Репродукция человека, 5(6):639-44.
4. Лабораторное руководство ВОЗ по изучению и обработке человеческой спермы, 5-е издание (2010 г.), стр. 102-107.
5. Эйткин Р.Дж., Кларксон Дж.С., Фишель С. (1989) Генерация активных форм кислорода, перекисное окисление липидов и функция спермы человека. Биология репродукции, 41(1):183-7.
6. Хилл Дж.А., Хаймович Ф., Политч Дж.А., Андерсон Д.Дж. (1987) Влияние растворимых продуктов активированных лимфоцитов и макрофагов (лимфокинов и монокинов) на параметры подвижности сперматозоидов человека. Фертильность и стерильность, 47(3):460-5.
7. Йоханиссон Э., Кампана А., Лути Р., де Агостини А. (2000) Оценка «круглых клеток» в анализе спермы: сравнительное исследование. Новости репродукции человека, 6(4):404-12.
8. Волфф Х. (1995). Биологическая значимость белых кровяных телец в сперме. Фертильность и стерильность. 63;1143.
9. Шарма Р.К., Паскуалотто А.Э., Нельсон Д.Р., Томас А.Дж., Агарвал А. (2001). Соотношение между количеством белых кровяных телец в сперме и оксидативного стресса у мужчин, проходящих лечение в клинике лечения бесплодия. Журнал андрологии: 22: 573-583.
10. Пунаб М., Лойвукене К., Кермес К., Мандар Р. (2003). Предел лейкоцитоспермии с микробиологической точки зрения. Андролоджика; 35:271-278.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ



FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Индустриепарк Норд 32,
8730 Бирнем, Бельгия.

Веб: <http://www.fertipro.com>

Эл. почта: info@fertipro.com

УПОЛНОМОЧЕННЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ В РОССИИ

ООО «ФерроТраст», ул. Карла Маркса, д. 8
офис 411, 620026, Екатеринбург,
Россия, тел.: 8(343) 269-40-45, 261-60-29,
эл.почта: frust96@mail.ru



Перевод с английского языка на русский язык выполнен мной, переводчиком Ермаковой Надеждой Алексеевной. Идентичность перевода подтверждаю.

Подпись переводчика

Ермакова Надежда Алексеевна

-бург

Российская Федерация

Город Екатеринбург Свердловской области

Двадцатого марта две тысячи двадцатого года

Я, Филиппова Ольга Владимировна, нотариус города Екатеринбурга, свидетельствую подлинность подписи переводчика Ермаковой Надежды Алексеевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 66/201-н/66-2020-8-574.

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 540 руб. 00 коп.

О.В. Филиппова

Лицензия № 309 от 06.03.2016 г. Главным управлением
Федеральной службы по Свердловской
области адрес: г. Екатеринбург, ул. 8
Марта, д. 7. Контактный телефон: 725, 371-89-72



Прошито в количестве 9 листов

«24» марта 2020 года

Директор направления "Клинические исследования"
ООО «ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
(лист 24)
Нотариус Филиппова О.В.

**Instruction for use of the medical device:
In vitro diagnostic kit for the determination
of peroxidase-positive leucocytes in human
semen - LeucoScreen Plus.**

VOOR EENSLUIDEND AFSCHRIFT

Gezien door ondergetekende Notaris Roel Mondelaers
te Aalter voor legalisatie van bovenstaande
handtekening(en) in zijn aanwezigheid geplaatst
van Sven Comhaire



APPROVE

FertiPro N.V., Belgium


President
(position)
Sven Comhaire
(name)
(signature)

"12" 03 2020
("day" month (numerals))

Stamp



Instructions for use

LeucoScreen Plus

In vitro diagnostic kit for the determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen (in the text below referred to as LeucoScreen Plus)

Ref. doc: FP09 1111 R01 A.3 Rus Update: 04/02/2020

For in vitro diagnostic use only - Reagent for professional use only

INTENDED USE

In vitro diagnostic kit for the determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen - LeucoScreen Plus is intended to be used for a semi-quantitative histochemical determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen.

INTRODUCTION

Most human ejaculates contain leucocytes and the predominant form of leucocytes in human semen are peroxidase-positive granulocytes^{1,2,3,4}. Excessive presence of these cells (leucocytospermia) may indicate the existence of reproductive tract infection. Leucocytospermia may also be associated with defects in the semen profile. This includes reductions in the volume of the ejaculate, decreased sperm concentration and sperm motility, as well as loss of sperm function as a result of oxidative stress^{2,5} and/or secretion of cytotoxic cytokines⁶. Although leucocytospermia is not an absolute indication of infertility, this condition is observed on average in 10 to 20% of all infertile men⁸.

When a typical semen analysis is performed, it is very difficult to differentiate white blood cells from other types of round cells in the semen sample (for example spermatogenic precursor cells⁷). A relatively rapid and inexpensive method of differentiating peroxidase positive white blood cells from other round cells in a semen sample makes use of the intrinsic peroxidase activity of these cells⁷. LeucoScreen Plus is, just like LeucoScreen, based on this technique and can therefore be used to stain the peroxidase positive white blood cells in a human semen sample.

According to the World Health Organization, the presence of more than one million peroxidase positive white blood cells (WBC) per ml ejaculate is considered abnormal and is labelled as "leucocytospermia"⁴. However, this threshold is under debate, as some have found this value too low and others too high. Indeed, threshold levels from 0.2×10^6 – 2×10^6 have been reported⁸⁻¹⁰.

When the threshold of one million peroxidase positive WBC per ml ejaculate is exceeded, microbiologic tests should be performed to investigate if there is an accessory gland infection. Assessment of accessory gland markers can provide additional useful information about the proper functioning of the epididymis (EpiScreen Plus, FertiPro NV, Belgium), seminal vesicles (Fructose Test – 96 Tests, FertiPro NV, Belgium) or prostate (Citric Acid Test – 96 Tests, FertiPro NV, Belgium). Importantly, the absence of leucocytes does not exclude the possibility of an accessory gland infection.

FIELD OF APPLICATION

Clinical laboratory diagnosis

INDICATIONS FOR USE

LeucoScreen Plus is intended to help in the diagnosis and treatment of male infertility.

CONTRINDICATIONS FOR USE

There are no contraindications for use for the LeucoScreen Plus kit.

INTENDED USER

LeucoScreen Plus is an IVD for professional use only and is intended to be used in healthcare institutions e.g. medical laboratories, specialized laboratories performing fertilization techniques, including IVF, ICSI and sperm preparation / analysis. The intended users are IVF professionals (lab technicians, andrologists, embryologists or medical doctors).

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

- Reagent 1: 1x6ml Substrate solution (contains 4CN, methanol)
- Reagent 2: 1x300µl Hydrogen peroxide (contains Hydrogen peroxide 30%)
- Reagent 3: 1x22ml Buffer solution (contains PBS, ProClin 950)
- Reagent 4: 1x1.2ml Counter stain solution (contains PBS, Ponceau S solution)

A certificate of analysis and the MSDS are available on our website (www.fertipro.com).

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT, BUT NEEDED FOR WORK WITH THE DEVICE

Microscope slides, cover glasses, test tubes (eppendorf), pipettes, bright field microscope.

SAMPLES ANALYZED

IVD

1. SPECIMEN TYPE

The test should be performed on fresh human semen samples containing more than 1×10^6 round cells per ml.

2. PROCEDURE FOR OBTAINING ANALYZED BIOLOGICAL MATERIAL

Semen collection by masturbation is preferred. Semen sample should be ejaculated into a clean, wide-mouthed container made of glass or plastic, from a batch that has been confirmed to be non-toxic for spermatozoa⁴.

3. CONDITIONS OF STORAGE OF ANALYZED SAMPLES OF BIOLOGICAL MATERIAL

It is recommended to perform the test at the same day of ejaculation, provided that samples are stored at 2-8°C.

4. SAMPLE COLLECTION, PROCESSING AND STORAGE

Semen collection should occur after a minimum of 2 days and a maximum of 7 days of sexual abstinence by masturbation⁴. The test should be performed within 1 day of ejaculation. Until testing is performed, the sample should be stored at 2-8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Peroxidase, present in the granules of certain leucocytes, oxidizes 4-chloro-1-naphthol (4CN) to a bluish-purple 4-chloro-1-naphthol precipitate, utilizing H_2O_2 as the oxidant. Reagent 4 contains a counter stain solution to facilitate the differentiation between peroxidase-positive round cells and peroxidase-negative round cells.

THE NUMBER OF SAMPLES ANALYSED

Kit has been designed for a maximum of 120 analyses. The working solution can be used for 22 x 2 consecutive days of analysis, with a maximum of 60 analyses per test day and a total maximum of 120 analyses over all test days.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In an independent validation study, 44 samples (containing > 1 mill/ml round cells) were analyzed by different operators with LeucoScreen and LeucoScreen Plus. Performance characteristics:

1. Range of the determination concentration of substance: no limitation on the minimum or maximum concentration of peroxidase-positive round cells that can be measured
2. Accuracy: Both kits provided comparable results based on Passing Bablok analysis.
3. Precision: Both kits can distinguish between peroxidase-positive and -negative round cells with comparable precision (LeucoScreen Plus: CV_{intra}: 12%; CV_{inter}: 10%)
4. Threshold value: a normal semen sample should not contain more than 1×10^6 peroxidase-positive white blood cells per ml
5. Diagnostic sensitivity: 88%, diagnostic specificity: 96%, when compared to LeucoScreen.

ANALYTICAL CHARACTERISTICS

1. Measurement range: no limitation on the minimum or maximum concentration of peroxidase-positive round cells that can be measured
2. Intra-assay CV < 15% (Repeatability)
3. Inter-assay CV < 15% (Reproducibility)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Use of gloves is advised. Reagent 1 contains methanol: avoid inhalation of vapors. Reagent 2 contains H_2O_2 : corrosive, causes burns. After contact with skin wash immediately with water and soap. Wear eye / face protection, medical gloves. All semen samples should be considered potentially infectious. Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis. Always use fresh pipette tips for each step to avoid cross-contamination. Do not discard product into the environment.

PRE-USE CHECK

Reagent 1 should contain a clear fluid, do not use the kit if the fluid has turned yellow.

CARRYING OUT THE ANALYSIS

We recommend to watch our demonstration video (download via link on our website, or scan barcode):



1. Count the number of round cells whilst determining the sperm concentration during routine semen analysis. Calculate and write down the total concentration of round cells in mill/mL, as this will be needed for the calculation of the concentration peroxidase-positive white blood cells.
2. When round cells concentration exceeds 1×10^6 per ml, the LeucoScreen Plus is indicated.

3. Prepare working solution: Add 200 µl Reagent 1, 5 µl Reagent 2 and 1 ml Reagent 3 to an Eppendorf tube and mix thoroughly. This working solution is stable for 48 hours when stored between 2-8°C, protected from (sun)light.
4. Take 10 µl of the semen sample and add 20 µl of working solution. Mix thoroughly.
5. Incubate for two minutes at room temperature in the dark.
6. Transfer 10 µl of the mix to the middle of a microscope glass and add 10 µl of Reagent 4. Mix thoroughly using the edge of the cover slip.
7. Cover with the cover slip
8. Count and classify a total of 200 round cells using a magnification of 400x. Scan different microscopic fields (preferably 20).

Note: In some semen samples, you might prefer to enrich the round cell concentration to facilitate cell counting. Therefore, centrifuge the sample for 15 minutes at 350g and resuspend the pellet.

In case of very high concentration of round cells, it is also possible to dilute the sample in FertiCult Flushing medium.

INTERPRETATION

- **Peroxidase positive round cells:** contain (bluish-)black granules and have an anthracite-grey cytoplasm. This anthracite area can cover the complete cell or only part of it.
- **Peroxidase negative round cells:** remain unstained or can be pink-colored. Granules seen in unstained cells are not surrounded by the typical anthracite-grey color seen in positive cells.

CALCULATION OF THE CONCENTRATION OF PEROXIDASE-POSITIVE WHITE BLOOD CELLS

- Calculate the proportion of peroxidase-positive cells as follows:

PROPORTION POSITIVE ROUND CELLS =

$$\frac{\text{Number of POSITIVE round cells}}{(\text{Number of POSITIVE round cells} + \text{Number of NEGATIVE round cells})}$$

- Now, calculate the concentration of peroxidase-positive white blood cells in the semen sample as follows:

CONCENTRATION (mill/mL) =

Proportion positive round cells x total concentration of round cells

Example:

- Total concentration of round cells is 2 mill/mL (determined during sperm concentration analysis)
- With the LeucoScreen Plus test, 120 round cells are found positive and 80 round cells are found negative
- Proportion positive round cells = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Concentration of peroxidase-positive white blood cells = $0.6 \times 2 \text{ mill/mL} = 1.2 \text{ mill/mL}$

EVALUATION OF RESULTS

The results should be evaluated taking into account all clinical and laboratory findings related to the sperm sample. According to the World Health Organization, the presence of more than 1×10^6 peroxidase positive white blood cells per ml ejaculate is considered abnormal and is labelled as "leucocytospermia, values below 1×10^6 peroxidase positive white blood cells per ml ejaculate should be considered as normal.

CONDITIONS OF STORAGE, TRANSPORTATION AND OPERATION OF THE DEVICE

Store reagents between 2°C-25°C. Suitable for transport or short-term storage at elevated temperatures (up to 5 days at 37°C). Do not freeze. Protect from (sun) light. The kit is stable for at least 12 months after production date (even after opening), do not use after expiry date mentioned on the product label. The bottles must be kept tightly closed at all times. The working solution can be stored up to 48 hours at 2-8°C, protected from (sun) light.

Products that are stored with noncompliance of the temperature limit, must not be used.

LIMITATIONS OF THE METHOD

This test is an aid in the diagnosis of male infertility and, as for other biological tests, interpretation of the results must be performed within the framework of clinical findings and data of history taking. The LeucoScreen Plus only stains peroxidase-positive WBC, other types of WBC (e.g. lymphocytes and monocytes) are not detected. On the other hand, it has been reported that the predominant form of leucocytes in human semen samples are peroxidase-positive leucocytes.

DISPOSAL

When a waste of Class A or B is formed during the use of the kit in the clinical diagnostic laboratory, this waste should be classified and disposed in accordance

with the requirements of SanPin 2.1.7.2790-10 "Sanitary – epidemiological requirements to the treatment of medical waste".

A kit's used, expired and unused reagents belong to class B and disposal should occur in accordance with the requirements of SanPin 2.1.7.2790-10.

The packaging of the reagents kit (box) after intended use belongs to class A waste and should be disposed as household waste.

SAFEGUARDS OBLIGATIONS

The manufacturer guarantees that the products are in accordance with the requirements declared by the manufacturer, if abide by the rules of use, transportation and storage.

If there are questions regarding the quality of a medical device, you must contact the authorized representative on Russian Federation territory: OOO "FerroTrust", Russia, Ekaterinburg, Karla Marks str., d. 8 of. 411.

PACKING

LeucoScreen Plus kits are packed in a cardboard box.

PRODUCT ORDER CODES

REF LEUCO_PLUS

MARKING



For in vitro diagnostic use



CE marking of conformity



Catalogue number



Batch number



Consult instructions for use



Date of manufacture



Manufacturer



Use-by date



Temperature limit



Protect from sunlight



Symbol of a voluntary certification



Oxidising



Flammable



Corrosive



Harmful/irritant



Respiratory hazard/serious health hazard



Acute toxicity

BIBLIOGRAPHY

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. Baratt, 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. 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.
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, Kennes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. Andrologica; 35:271-278.

MANUFACTURER



FertiPro N.V., Industriepark Noord 32,
8730 Beernem, Belgium.
URL: <http://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com

AUTHORIZED REPRESENTATIVE IN RUSSIA

FerroTrust LTD, Karl Marks str., D. 8
office 411, 620026, Ekaterinburg,
Russia, tel.: 8(343) 269-40-45, 261-60-29,
e-mail: fttrust96@mail.ru



**Инструкция по применению на медицинское
изделие:
Набор для диагностики in vitro для
определения пероксидаза-положительных
лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen
Plus.**

КОПИЯ ВЕРНА

Штамп: Нижеподписавшийся Нотариус города
Алтер Розль Монделаерс настоящим
свидетельствует, что подпись,
поставленная в его присутствии,
принадлежит Свену Комхаирэ

[Круглая печать: Розль Монделаерс, Нотариус *
9880 Алтер]

/подпись/

УТВЕРЖДАЮ

FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Бельгия

Президент
(должность)

Свен Комхаирэ
(имя)

/подпись/
(подпись)

«12» 03. 2020 года
("день" месяц (цифрами))

Штамп:

FertiPro nv
Индустриепарк 32
В-8730 Бирнем/Бельгия
идентификационный номер
плательщика НДС: BE 0448 767 035

Печать

FertiPro

ЕРМАКОВА Е. А.

Инструкция по применению

LeucoScreen Plus

IVD

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека (далее по тексту - LeucoScreen Plus).

Выпускается на документ: FP09 I111 R01 A.3_Rus Update: 04/02/2020

Набор для использования для диагностики in vitro - Реагенты только для профессионального использования

ПОЛЬЗОВАНИЕ ПО НАЗНАЧЕНИЮ

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen Plus предназначен для количественного гистохимического определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека.

ВЕДЕНИЕ

Большая часть эякулятов человека содержит лейкоциты, и преобладающей группой лейкоцитов в образцах спермы человека являются пероксидаза-положительные гранулоциты^{1,2,3,4}. Чрезмерное присутствие этих клеток (лейкоцитоспермия) может указывать на существование инфекции половых путей. Лейкоцитоспермия также может быть связана с дефектами профиля спермы. Сюда входит уменьшение объема эякулята, снижение концентрации сперматозоидов и их подвижности, а также утрата функции спермы в результате оксидативного стресса^{2,5} и/или секреции цитотоксических токсинов⁶. Несмотря на то, что лейкоцитоспермия не является абсолютным показателем бесплодия, это состояние наблюдается в среднем у 10-20% всех бесплодных мужчин⁸.

При выполнении стандартного анализа спермы крайне сложно дифференцировать белые кровяные клетки от прочих типов круглых клеток в образце спермы (например, сперматогенные клетки-предшественники⁷). Наиболее быстрый и недорогой способ дифференцировать пероксидаза-положительные белые кровяные клетки от прочих круглых клеток в образце спермы использует естественную пероксидазную активность этих клеток⁷. LeucoScreen Plus, как и LeucoScreen, основан на этой технике и, следовательно, может использоваться для окрашивания пероксидаза-положительных белых кровяных клеток в образцах человеческой спермы.

В данном Всемирной организации здравоохранения наличие более чем одного миллиона пероксидаза-положительных белых кровяных клеток (БКК) в мл эякулята считается аномальным и обозначается как «лейкоцитоспермия»⁴. Однако этот порог находится под вопросом, так как некоторые считают такое значение слишком низким, другие - слишком высоким. В действительности имеются данные о пороговых значениях в диапазоне от $0,2 \times 10^6$ до 2×10^6 $8-10$.

При пороговом значении в миллион пероксидаза-положительных БКК на мл эякулята превышен, должны быть проведены микробиологические тесты с целью выявления инфекций придаточных желез. Оценка маркеров придаточной железы может дать дополнительные полезные данные о работе эпидидимиса (EpiScreen Plus, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В), Бельгия), семенных пузырьков (Fructose Test - 96 Tests, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В), Бельгия) или простаты (Citric Acid Test - 96 Tests, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В), Бельгия). Важно отметить, что отсутствие лейкоцитов исключает возможности инфекции придаточной железы.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

LeucoScreen Plus предназначен для помощи в диагностировании и лечении мужского бесплодия.

КОНТРАПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Контрапоказаний к применению набора LeucoScreen Plus нет.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

LeucoScreen Plus - это набор для диагностики in vitro исключительно для профессионального использования, предназначенный для использования в лабораториях здравоохранения, напр., медицинскими лабораториями, специализированными лабораториями, применяющими различные техники подготовки, включая ЭКО, ИКСИ и подготовку / анализ спермы. Предполагаемые пользователи - это профессионалы в области ВРТ, лабораторные техники, андрологи, эмбриологи или врачи).

МАТЕРИАЛЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1: 1х6мл Раствор субстрата (содержит 4СН, метанол)

Реагент 2: 1х300мкл Перекись водорода (содержит 30% перекись водорода)

Реагент 3: 1х22мл Буферный раствор (содержит фосфатно-солевой буфер, ProClin 950)

Реагент 4: 1х1,2мл Контр-окрашивающий раствор (содержит фосфатно-солевой буфер, раствор Понсо S)

Протокол анализа и паспорт безопасности представлены на нашем интернет-сайте (www.fertipro.com).

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР, НО НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИЗДЕЛИЕМ

Предметные стекла, покровные стекла, пробирки (Эппендорф), пипетки, светлоскопный микроскоп.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

1. ТИП ОБРАЗЦА

Тест должен проводиться на свежих образцах спермы человека, содержащих более 1×10^6 круглых клеток на мл.

2. ПРОЦЕДУРА СБОРА АНАЛИЗИРУЕМОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Предпочтительным является сбор спермы путём мастурбации. Образец спермы должен быть эякулирован в чистую ёмкость с широким горлышком, изготовленную из стекла или пластика, из лота, который был подтверждён как нетоксичный для сперматозоидов⁴.

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Рекомендуется проводить тест в день эякуляции, при условии, что образцы хранятся при температуре 2-8°C.

4. СБОР, ОБРАБОТКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сбор спермы должен происходить не ранее чем через 2 дня и не позднее чем через 7 дней полового воздержания путём мастурбации⁴. Тест должен быть выполнен в день сбора спермы. До проведения испытаний образец следует хранить при температуре 2-8°C.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Пероксидаза, присутствующая в гранулах некоторых лейкоцитов, окисляет 4-хлор-1-нафтол (4СН) до сине-фиолетового осадка 4-хлор-1-нафтона, используя H_2O_2 как окислитель. Реагент 4, содержит контр-окрашивающий раствор для облегчения дифференциации между пероксидаза-положительными и пероксидаза-отрицательными круглыми клетками.

КОЛИЧЕСТВО АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Набор был разработан для 120 анализов максимум. Рабочий раствор может использоваться для 22 x 2 последовательных дней анализа для максимума 60 анализов за один день тестов и общим количеством анализов за все дни тестов равным 120.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

В независимом валидационном исследовании разными лаборантами были проанализированы 44 образца (содержащих > 1 миллиона круглых клеток на мл) с использованием LeucoScreen и LeucoScreen Plus.

Рабочие характеристики:

1. Диапазон определения концентрации вещества: ограничений по минимальной или максимальной концентрациям пероксидаза-положительных круглых клеток, которые могут быть измерены, нет
2. Точность: Оба набора дали сравнимые результаты по анализу Пассинга-Бэблока.
3. Прецизионность: Оба набора могут дифференцировать пероксидаза-положительные и -отрицательные круглые клетки со сравнимой степенью достоверности (LeucoScreen Plus: CV_{intra}: 12%; CV_{inter}: 10%)
4. Пороговое значение: нормальный образец спермы не должен содержать более 1×10^6 пероксидаза-положительных лейкоцитов /мл.
5. Диагностическая чувствительность: 88%, диагностическая специфичность: 96%, по сравнению с LeucoScreen.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Диапазон измерений: ограничений по минимальной или максимальной концентрациям пероксидаза-положительных круглых клеток, которые могут быть измерены, нет
2. Внутрианалитический коэффициент вариации <15% (Повторяемость)
3. Межаналитический коэффициент вариации <15% (Воспроизводимость)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Рекомендуется использование перчаток. Реагент 1 содержит метанол: избегайте вдыхания паров. Реагент 2 содержит H_2O_2 : коррозионное вещество, вызывает ожоги. После контакта с кожей немедленно промойте этот участок водой и мылом. Надевайте защитные очки / маску, медицинские перчатки. Все образцы спермы считаются потенциально заразными. Со всеми образцами

Перевод с английского языка на русский язык

дуют обращаться так, как если бы через них может передаваться ВИЧ или гепатит. Всегда используйте свежие наконечники пипеток для предотвращения перекрестной контаминации. Не выбрасывайте продукт в загрязняющую среду.

ОБЕРКА ПЕРЕД НАЧАЛОМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Реагент 1 должен содержать прозрачную жидкость, не используйте набор, если жидкость стала желтой.

ВВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Мы рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачайте по ссылке с нашего интернет-сайта или просканируйте QR-код):



Посчитайте количество круглых клеток при определении концентрации сперматозоидов в течение стандартного анализа спермы. Рассчитайте и запишите общую концентрацию круглых клеток в миллионах на миллилитр, так как это понадобится для расчета концентрации пероксидаза-положительных белых кровяных клеток.

LeucoScreen Plus показан, если концентрация круглых клеток превышает 10^6 на мл.

Подготовьте рабочий раствор: Добавьте Реагента 1 - 200 мкл, Реагента 2 - 100 мкл и Реагента 3 - 1 мл в пробирку Эппендорф и тщательно перемешайте. Рабочий раствор стабилен в течение 48 часов, если хранить его при температуре 2-8°C в защищенном от (солнечного) света месте.

Возьмите 10 мкл образца спермы и добавьте 20 мкл рабочего раствора. Тщательно перемешайте.

Выдерживайте в течение двух минут при комнатной температуре в темноте.

Поместите 10 мкл смеси в середину предметного стекла микроскопа и добавьте 10 мкл Реагента 4. Тщательно перемешайте краем покровного стекла.

Накройте покровным стеклом.

Подсчитайте и классифицируйте круглые клетки общим количеством 200 клеток при 400-кратном увеличении. Просканируйте различные поля зрения микроскопа (желательно 20).

Примечание: в случае некоторых образцов спермы вы, возможно, посчитаете нужным увеличить концентрацию круглых клеток для облегчения подсчета. В этом случае центрифугируйте образец в течение 15 минут при 350g и ресуспендируйте осадок.

В случае очень высокой концентрации круглых клеток также возможно использовать образец в среде FertiCult Flushing.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Пероксидаза-положительные круглые клетки: содержат (сине-)черные гранулы, и их цитоплазма антрацитово-серая. Антрацитово-серая область может покрывать всю клетку или ее часть.

Пероксидаза-отрицательные круглые клетки: остаются неокрашенными или могут быть окрашены в розовый. Гранулы, которые видны в неокрашенных клетках, не окружены типичным антрацитово-серым цветом, наблюдаемым в положительных клетках.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗА-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БЕЛЫХ КРОВЯНЫХ КЛЕТОК

Рассчитайте пропорцию пероксидаза-положительных клеток по следующей формуле:

ПРОПОРЦИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КРУГЛЫХ КЛЕТОК =

Количество ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ круглых клеток

(Кол-во ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ круглых клеток + Кол-во ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ круглых клеток)

Теперь рассчитайте концентрацию пероксидаза-положительных белых кровяных клеток в образце спермы по следующей формуле:

КОНЦЕНТРАЦИЯ (млн/мл) =

Пропорция положительных круглых клеток x общая концентрация круглых клеток

Пример:

Общая концентрация круглых клеток - 2 млн/мл (определена в ходе анализа на концентрацию сперматозоидов)

При помощи набора LeucoScreen Plus 120 круглых клеток идентифицированы как положительные и 80 - как отрицательные

Пропорция положительных круглых клеток = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$

Концентрация пероксидаза-положительных белых кровяных клеток = $0,6 \times 2 \text{ млн/мл} = 1,2 \text{ млн/мл}$

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты должны оцениваться с учетом всех клинических и лабораторных данных, связанных с образцом спермы. По данным Всемирной организации здравоохранения, наличие более 1×10^6

пероксидаза - положительных лейкоцитов на мл эякулята считается ненормальным и отмечается как «лейкоцитоспермия», значения ниже 1×10^6 пероксидаза - положительных лейкоцитов на мл эякулята следует считать нормальным.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЯ

Храните реагенты при температуре 2°C-25°C. Возможна транспортировка или краткосрочное хранение при повышенной температуре (до 5 дней при 37°C). Не подвергайте заморозке. Храните в защищенном от (солнечного) света месте. Набор стабилен в течение не менее 12 месяцев с даты производства (даже после вскрытия). Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке. Всегда держите флаконы плотно закрытыми. Рабочий раствор можно хранить до 48 часов при 2-8°C в защищенном от (солнечного) света месте.

Изделия, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный тест является вспомогательным инструментом при диагностировании мужского бесплодия, и, как и в случае с другими биологическими тестами, интерпретация результатов должна осуществляться в рамках клинической картины и данных сбора анамнеза. LeucoScreen Plus окрашивает только пероксидаза-положительные БКК, прочие типы БКК (напр., лимфоциты и моноциты) им не обнаруживаются. С другой стороны, имеются данные о том, что преобладающей формой лейкоцитов в образцах спермы человека являются пероксидаза-положительные лейкоциты.

УТИЛИЗАЦИЯ

При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно - эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами".

После использования набора, просроченные и неиспользованные реагенты относятся к классу Б и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Упаковка набора реагентов (коробки) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется вместе с бытовыми отходами.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Изготовитель гарантирует, что продукция соответствует требованиям, заявленным изготовителем, при условии соблюдения правил использования, транспортировки и хранения.

При возникновении вопросов по качеству медицинского изделия следует обращаться к уполномоченному представителю на территории Российской Федерации: ООО «ФерроТраст», Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 8 оф. 411.

УПАКОВКА

Наборы LeucoScreen Plus упакованы в картонные коробки.

КОДЫ ЗАКАЗА ПРОДУКЦИИ

REF

LEUCO_PLUS

МАРКИРОВКА

IVD

Для диагностики in vitro

CE

Маркировка соответствия нормам ЕС

REF

Номер по каталогу

LOT

Код партии

i

Обратитесь к инструкции по применению

📅

Дата изготовления

🏭

Изготовитель

🕒

Использовать до...

🌡

Температурный диапазон

☀

Не допускать воздействия солнечного света

PC

Символ добровольной сертификации в РФ

ЕРМАКОВА Е.А.



Окислитель



Легковоспламеняющаяся жидкость



Едкое вещество



Опасное/раздражающее вещество



Опасность для органов дыхания/серьезная угроза здоровью



Острая токсичность

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Волфф Х., Андерсон Д.Дж. (1988) Иммуногистологическая категоризация и квантификация субпопуляции лейкоцитов в человеческой сперме. Фертильность и стерильность, 49(3): 497-504
2. Эйткен Р.Дж., Уэст К.М. (1990) Анализ соотношения между продукцией активных форм кислорода и проникновением лейкоцитов во фракции человеческой спермы, разделенные на градиенты плотности Percoll. Международный журнал андрологии, 13 (6):433-51.
3. Барратт К.Л.Р., Болтон А.Э., Кук И.Д. (1990) Функциональная значимость белых кровяных телец в мужских и женских половых путях. Репродукция человека, 5(6):639-44.
4. Лабораторное руководство ВОЗ по изучению и обработке человеческой спермы, 5-е издание (2010 г.), стр. 102-107.
5. Эйткен Р.Дж., Кларксон Дж.С., Фишель С. (1989) Генерация активных форм кислорода, перекисное окисление липидов и функция спермы человека. Биология репродукции, 41(1):183-7.
6. Хилл Дж.А., Хаймовичи Ф., Политч Дж.А., Андерсон Д.Дж. (1987) Влияние растворимых продуктов активированных лимфоцитов и макрофагов (лимфокинов и монокинов) на параметры подвижности сперматозоидов человека. Фертильность и стерильность, 47(3):460-5.
7. Йоханиссон Э., Кампана А., Лути Р., де Агостини А. (2000) Оценка «круглых клеток» в анализе спермы: сравнительное исследование. Новости репродукции человека, 6(4):404-12.
8. Волфф Х. (1995). Биологическая значимость белых кровяных телец в сперме. Фертильность и стерильность. 63:1143.
9. Шарма Р.К., Паскуалотто А.Э., Нельсон Д.Р., Томас А.Дж., Агарвал А. (2001). Соотношение между количеством белых кровяных телец в сперме и окислительного стресса у мужчин, проходящих лечение в клинике лечения бесплодия. Журнал андрологии: 22: 573-583.
10. Пунаб М., Лойвукене К., Кермес К., Мандар Р. (2003). Предел лейкоцитоспермии с микробиологической точки зрения. Андролоджика, 35:271-278.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ



FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Индустриепарк Норд 32,
8730 Бирнем, Бельгия.
Веб: <http://www.fertipro.com>
Эл. почта: info@fertipro.com

УПОЛНОМОЧЕННЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ В РОССИИ

ООО «ФерроТраст», ул. Карла Маркса, д. 8
офис 411, 620026, Екатеринбург,
Россия, тел.: 8(343) 269-40-45, 261-60-29,
эл.почта: fttrust96@mail.ru



Перевод с английского языка на русский язык выполнен мной, переводчиком Ермаковой Надеждой Алексеевной. Идентичность перевода подтверждаю.

Подпись переводчика

Ермакова Надежда Алексеевна

-бург

Российская Федерация

Город Екатеринбург Свердловской области

Двадцать пятого марта две тысячи двадцатого года

Я, Филиппова Ольга Владимировна, нотариус города Екатеринбурга, свидетельствую подлинность подписи переводчика Ермаковой Надежды Алексеевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 66/201-н/66-2020-3-458.

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 540 руб. 00 коп.

О.В. Филиппова

Лицензия № 309 выдана 09.08.2006 г. Главным управлением Федеральной регистрационной службы по Свердловской области адрес нотариальной конторы: г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, д. 7, тел. (343) 3-724-725, 371-89-72



Протитуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
(подпись) лист 46
нотариус Филиппова О.В.



uuefj

**Instruction for use of the medical device:
In vitro diagnostic kit for the determination
of peroxidase-positive leucocytes in human
semen - LeucoScreen Plus.**

APPROVE

FertiPro N.V., Belgium

President
(position)
Sven Comhaire
(name)
(signature)

"28" / 10 2019
("day" month (numerals))

Stamp

Gezien door ondergetekende Notaris Roel Mondelaers
te Aalter voor legalisatie van bovenstaande
handtekening(en) in zijn aanwezigheid geplaatst
van 20.11.2019



Instructions for use

LeucoScreen Plus

IVD

In vitro diagnostic kit for the determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen (in the text below referred to as LeucoScreen Plus)

Ref. doc: FP09 1111 R01 A.3_Rus Update: 24/09/2019

For in vitro diagnostic use only - Reagent for professional use only

INTENDED USE

In vitro diagnostic kit for the determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen - LeucoScreen Plus is intended to be used for a semi-quantitative histochemical determination of peroxidase-positive leucocytes in human semen.

INTRODUCTION

Most human ejaculates contain leucocytes and the predominant form of leucocytes in human semen are peroxidase-positive granulocytes^{1,2,3,4}. Excessive presence of these cells (leucocytospermia) may indicate the existence of reproductive tract infection. Leucocytospermia may also be associated with defects in the semen profile. This includes reductions in the volume of the ejaculate, decreased sperm concentration and sperm motility, as well as loss of sperm function as a result of oxidative stress^{2,5} and/or secretion of cytotoxic cytokines⁶. Although leucocytospermia is not an absolute indication of infertility, this condition is observed on average in 10 to 20% of all infertile men⁸.

When a typical semen analysis is performed, it is very difficult to differentiate white blood cells from other types of round cells in the semen sample (for example spermatogenic precursor cells⁷). A relatively rapid and inexpensive method of differentiating peroxidase positive white blood cells from other round cells in a semen sample makes use of the intrinsic peroxidase activity of these cells⁷. LeucoScreen Plus is, just like LeucoScreen, based on this technique and can therefore be used to stain the peroxidase positive white blood cells in a human semen sample.

According to the World Health Organization, the presence of more than one million peroxidase positive white blood cells (WBC) per ml ejaculate is considered abnormal and is labelled as "leucocytospermia"⁴. However, this threshold is under debate, as some have found this value too low and others too high. Indeed, threshold levels from 0.2×10^6 - 2×10^6 have been reported⁸⁻¹⁰.

When the threshold of one million peroxidase positive WBC per ml ejaculate is exceeded, microbiologic tests should be performed to investigate if there is an accessory gland infection. Assessment of accessory gland markers can provide additional useful information about the proper functioning of the epididymis (EpiScreen Plus, FertiPro NV, Belgium), seminal vesicles (Fructose Test - 96 Tests, FertiPro NV, Belgium) or prostate (Citric Acid Test - 96 Tests, FertiPro NV, Belgium). Importantly, the absence of leucocytes does not exclude the possibility of an accessory gland infection.

FIELD OF APPLICATION

Clinical laboratory diagnostic

INDICATIONS FOR USE

LeucoScreen Plus is intended to help in the diagnosis and treatment of male infertility.

CONTRINDICATIONS FOR USE

There are no contraindications for use for the LeucoScreen Plus kit.

INTENDED USER

LeucoScreen Plus is an IVD for professional use only and is intended to be used in healthcare institutions e.g. medical laboratories, specialized laboratories performing fertilization techniques, including IVF, ICSI and sperm preparation / analysis. The intended users are IVF professionals (lab technicians, andrologists, embryologists or medical doctors).

MATERIAL INCLUDED WITH THE KIT

- Reagent 1: 1x6ml Substrate solution (contains 4CN, methanol)
- Reagent 2: 1x300µl Hydrogen peroxide (contains Hydrogen peroxide 30%)
- Reagent 3: 1x22ml Buffer solution (contains PBS, ProClin 950)
- Reagent 4: 1x1.2ml Counter stain solution (contains PBS, Ponceau S solution)

A certificate of analysis and the MSDS are available on our website (www.fertipro.com).

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT, BUT NEEDED FOR WORK WITH THE DEVICE

Microscope slides, cover glasses, test tubes (eppendorf), pipettes, bright field microscope.

SAMPLES ANALYZED

1. SPECIMEN TYPE

The test should be performed on fresh human semen samples containing more than 1×10^6 round cells per ml.

2. PROCEDURE FOR OBTAINING ANALYZED BIOLOGICAL MATERIAL

Semen collection by masturbation is preferred. Semen sample should be ejaculated into a clean, wide-mouthed container made of glass or plastic, from a batch that has been confirmed to be non-toxic for spermatozoa⁴.

3. CONDITIONS OF STORAGE OF ANALYZED SAMPLES OF BIOLOGICAL MATERIAL

It is recommended to perform the test at the same day of ejaculation, provided that samples are stored at 2-8°C.

4. SAMPLE COLLECTION, PROCESSING AND STORAGE

Semen collection should occur after a minimum of 2 days and a maximum of 7 days of sexual abstinence by masturbation⁴. The test should be performed within 1 day after ejaculation. Until testing is performed, the sample should be stored at 2-8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Peroxidase, present in the granules of certain leucocytes, oxidizes 4-chloro-1-naphthol (4CN) to a bluish-purple 4-chloro-1-naphthol precipitate, utilizing H_2O_2 as the oxidant. Reagent 4 contains a counter stain solution to facilitate the differentiation between peroxidase-positive round cells and peroxidase-negative round cells.

INTERPRETATION

- **Peroxidase positive round cells:** contain (bluish-)black granules and have an anthracite-grey cytoplasm. This anthracite area can cover the complete cell or only part of it.
- **Peroxidase negative round cells:** remain unstained or can be pink-colored. Granules seen in unstained cells are not surrounded by the typical anthracite-grey color seen in positive cells.

THE NUMBER OF SAMPLES ANALYSED

Kit has been designed for a maximum of 120 analyses. The working solution can be used for 22 x 2 consecutive days of analysis, with a maximum of 60 analyses per test day and a total maximum of 120 analyses over all test days.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In an independent validation study, 44 samples (containing > 1 mill/ml round cells) were analyzed by different operators with LeucoScreen and LeucoScreen Plus. Performance characteristics:

1. Range of the determination concentration of substance: no limitation on the minimum or maximum concentration of peroxidase-positive round cells that can be measured
2. Accuracy: Both kits provided comparable results based on Passing Bablok analysis.
3. Precision: Both kits can distinguish between peroxidase-positive and -negative round cells with comparable precision (LeucoScreen Plus: CV_{intra}: 12%; CV_{inter}: 10%)
4. The values of concentration of substance: a normal semen sample should not contain more than 1×10^6 Peroxidase positive leucocytes /ml

ANALYTICAL CHARACTERISTICS

1. Measurement range: no limitation on the minimum or maximum concentration of peroxidase-positive round cells that can be measured
2. Intra-assay CV < 15% (Repeatability)
3. Inter-assay CV < 15% (Reproducibility)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Use of gloves is advised. Reagent 1 contains methanol: avoid inhalation of vapors. Reagent 2 contains H_2O_2 : corrosive, causes burns. After contact with skin wash immediately with water and soap. Wear eye / face protection, medical gloves. All semen samples should be considered potentially infectious. Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis. Always use fresh pipette tips for each step to avoid cross-contamination. Do not discard product into the environment

PRE-USE CHECK

Reagent 1 should contain a clear fluid, do not use the kit if the fluid has turned yellow.

CARRYING OUT THE ANALYSIS

We recommend to watch our demonstration video (download via link on our website, or scan barcode):



1. Count the number of round cells whilst determining the sperm concentration during routine semen analysis. Calculate and write down the total concentration of round cells in mill/mL, as this will be needed for the calculation of the concentration peroxidase-positive white blood cells.
2. When round cells concentration exceeds 1×10^6 per mL, the LeucoScreen Plus is indicated.
3. Prepare working solution: Add 200 μ L Reagent 1, 5 μ L Reagent 2 and 1 mL Reagent 3 to an Eppendorf tube and mix thoroughly. This working solution is stable for 48 hours when stored between 2-8°C, protected from (sun)light.
4. Take 10 μ L of the semen sample and add 20 μ L of working solution. Mix thoroughly.
5. Incubate for two minutes at room temperature in the dark.
6. Transfer 10 μ L of the mix to the middle of a microscope glass and add 10 μ L of Reagent 4. Mix thoroughly using the edge of the cover slip.
7. Cover with the cover slip
8. Count and classify a total of 200 round cells using a magnification of 400x. Scan different microscopic fields (preferably 20).

Note: In some semen samples, you might prefer to enrich the round cell concentration to facilitate cell counting. Therefore, centrifuge the sample for 15 minutes at 350g and resuspend the pellet.

In case of very high concentration of round cells, it is also possible to dilute the sample in FertiCult Flushing medium.

CALCULATION OF THE CONCENTRATION OF PEROXIDASE-POSITIVE WHITE BLOOD CELLS

- Calculate the proportion of peroxidase-positive cells as follows:

$$\text{PROPORTION POSITIVE ROUND CELLS} = \frac{\text{Number of POSITIVE round cells}}{(\text{Number of POSITIVE round cells} + \text{Number of NEGATIVE round cells})}$$

- Now, calculate the concentration of peroxidase-positive white blood cells in the semen sample as follows:

$$\text{CONCENTRATION (mill/mL)} = \text{Proportion positive round cells} \times \text{total concentration of round cells}$$

Example:

- Total concentration of round cells is 2 mill/mL (determined during sperm concentration analysis)
- With the LeucoScreen Plus test, 120 round cells are found positive and 80 round cells are found negative
- Proportion positive round cells = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Concentration of peroxidase-positive white blood cells = $0.6 \times 2 \text{ mill/mL} = 1.2 \text{ mill/mL}$

CONDITIONS OF STORAGE, TRANSPORTATION AND OPERATION OF THE DEVICE

Store reagents between 2°C-25°C. Suitable for transport or short-term storage at elevated temperatures (up to 5 days at 37°C). Do not freeze. Protect from (sun) light. The kit is stable for at least 12 months after production date (even after opening), do not use after expiry date mentioned on the product label. The bottles must be kept tightly closed at all times. The working solution can be stored up to 48 hours at 2-8°C, protected from (sun) light.

Products that are stored with noncompliance of the temperature limit, must not be used.

LIMITATIONS OF THE METHOD

This test is an aid in the diagnosis of male infertility and, as for other biological tests, interpretation of the results must be performed within the framework of clinical findings and data of history taking. The LeucoScreen Plus only stains peroxidase-positive WBC, other types of WBC (e.g. lymphocytes and monocytes) are not detected. On the other hand, it has been reported that the predominant form of leucocytes in human semen samples are peroxidase-positive leucocytes.

DISPOSAL

When a waste of Class A or B is formed during the use of the kit in the clinical diagnostic laboratory, this waste should be classified and disposed in accordance with the requirements of SanPin 2.1.7.2790-10 "Sanitary – epidemiological requirements to the treatment of medical waste".

A kit's used, expired and unused reagents belong to class B and disposal should occur in accordance with the requirements of SanPin 2.1.7.2790-10.

The packaging of the reagents kit (box) after intended use belongs to class A waste and should be disposed as household waste.

SAFEGUARDS OBLIGATIONS

The manufacturer guarantees that the products are in accordance with the requirements declared by the manufacturer, if abide by the rules of use, transportation and storage.

If there are questions regarding the quality of a medical device, you must contact the authorized representative on Russian Federation territory: OOO "FerroTrust", Russia, Ekaterinburg, Karla Marks str., d. 8 of. 411.

PACKING

LeucoScreen Plus kits are packed in a cardboard box.

PRODUCT ORDER CODES

REF LEUCO_PLUS

MARKING

	For in vitro diagnostic use
	CE marking of conformity
	Catalogue number
	Batch number
	Consult instructions for use
	Date of manufacture
	Manufacturer
	Use-by date
	Temperature limit
	Protect from sunlight
	Symbol of a voluntary certification
	Oxidising
	Flammable
	Corrosive
	Harmful/irritant
	Respiratory hazard/serious health hazard
	Acute toxicity

BIBLIOGRAPHY

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.

MANUFACTURER



FertiPro N.V., Industriepark Noord 32,
8730 Beernem, Belgium.

URL: <http://www.fertipro.com>

E-mail: info@fertipro.com

AUTHORIZED REPRESENTATIVE IN RUSSIA

FerroTrust LTD, Karl Marks str., D. 8

office 411, 620026, Ekaterinburg,

Russia, tel.: 8(343) 269-40-45, 261-60-29,

e-mail: fttrust96@mail.ru



**Инструкция по применению на медицинское
изделие:
Набор для диагностики in vitro для
определения пероксидаза-положительных
лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen
Plus.**

[Штамп:]

Нижеподписавшийся Нотариус города
Алтер Розль Монделаерс настоящим
свидетельствует, что подпись,
поставленная в его присутствии,
принадлежит Свену Комхаире

/подпись/

[Круглая печать: Розль Монделаерс, Нотариус *
9880 Алтер]

FertiPro nv (ФертиПро нв)
Индустриепарк Норд 32
В-8730 Бирнем/Бельгия
идентификационный номер
плательщика
НДС: BE 0448 767 035

УТВЕРЖДАЮ

FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.),
Бельгия

Президент
(должность)

Свен Комхаирэ
(имя)

/подпись/
(подпись)

«28» /10/ 2019 года
("день" месяц (цифрами))

МП

FertiPro
ЕРМАКОВА Н. А.

Перевод с английского языка на русский язык

Инструкция по применению

LeucoScreen Plus

IVD

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека (далее по тесту - LeucoScreen Plus)

Ссылка на документ: FP09 I111 R01 A.3_Rus Update: 24/09/2019

Только для использования для диагностики in vitro - Реагенты только для профессионального использования

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПО НАЗНАЧЕНИЮ

Набор для диагностики in vitro для определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека - LeucoScreen Plus предназначен для полуколичественного гистохимического определения пероксидаза-положительных лейкоцитов в сперме человека.

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть эякулятов человека содержит лейкоциты, и преобладающей формой лейкоцитов в образцах спермы человека являются пероксидаза-положительные гранулоциты^{1,2,3,4}. Чрезмерное присутствие этих клеток (лейкоцитоспермия) может указывать на существование инфекции половых путей. Лейкоцитоспермия также может быть связана с дефектами профиля спермы. Сюда входит уменьшение объема эякулята, снижение концентрации сперматозоидов и их подвижности, а также утрата функции спермы в результате оксидативного стресса^{2,5} и/или секреции цитотоксических цитокинов⁶. Несмотря на то, что лейкоцитоспермия не является абсолютным показателем бесплодия, это состояние наблюдается в среднем у 10-20% всех бесплодных мужчин⁸.

При выполнении стандартного анализа спермы крайне сложно дифференцировать белые кровяные клетки от прочих типов круглых клеток в образце спермы (например, сперматогенные клетки-предшественники⁷). Относительно быстрый и недорогой способ дифференцировать пероксидаза-положительные белые кровяные клетки от прочих круглых клеток в образце спермы использует естественную пероксидазную активность этих клеток⁷. LeucoScreen Plus, как и LeucoScreen, основан на этой технике и, следовательно, может использоваться для окрашивания пероксидаза-положительных белых кровяных клеток в образцах человеческой спермы.

По данным Всемирной организации здравоохранения наличие более чем одного миллиона пероксидаза-положительных белых кровяных клеток (БКК) на мл эякулята считается аномальным и обозначается как «лейкоцитоспермия»⁴. Однако этот порог находится под вопросом, так как некоторые считают такое значение слишком низким, другие - слишком высоким. В действительности имеются данные о пороговых значениях в диапазоне от $0,2 \times 10^6$ до 2×10^6 ⁸⁻¹⁰.

Если пороговое значение в миллион пероксидаза-положительных БКК на мл эякулята превышено, должны быть проведены микробиологические тесты с целью выявления инфекций придаточных желез. Оценка маркеров придаточной железы может дать дополнительные полезные данные о должной работе эпидидимиса (EpiScreen Plus, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В), Бельгия), семенных пузырьков (Fructose Test - 96 Tests, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В), Бельгия) или простаты (Citric Acid Test - 96 Tests, FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В), Бельгия). Важно отметить, что отсутствие лейкоцитов не исключает возможности инфекции придаточной железы.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

LeucoScreen Plus предназначен для помощи в диагностировании и лечении мужского бесплодия.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний к применению набора LeucoScreen Plus нет.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

LeucoScreen Plus - это набор для диагностики in vitro исключительно для профессионального использования, предназначенный для использования учреждениями здравоохранения, напр., медицинскими лабораториями, специализированными лабораториями, применяющими различные техники оплодотворения, включая ЭКО, ИКСИ и подготовку / анализ спермы. Предполагаемые пользователи - это профессионалы в области ВРТ (лабораторные техники, андрологи, эмбриологи или врачи).

МАТЕРИАЛЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Реагент 1: 1х6мл Раствор субстрата (содержит 4CN, метанол)
- Реагент 2: 1х300мкл Перекись водорода (содержит 30% перекись водорода)
- Реагент 3: 1х22мл Буферный раствор (содержит фосфатно-солевой буфер, ProClin 950)

- Реагент 4: 1х1,2мл Контр-окрашивающий раствор (содержит фосфатно-солевой буфер, раствор Понсо S)

Протокол анализа и паспорт безопасности представлены на нашем интернет-сайте (www.fertipro.com).

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР, НО НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИЗДЕЛИЕМ

Предметные стекла, покровные стекла, пробирки (Эппендорф), пипетки, светопольный микроскоп.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

1. ТИП ОБРАЗЦА

Тест должен проводиться на свежих образцах спермы человека, содержащих более 1×10^6 круглых клеток на мл. Тест должен проводиться в день забора спермы.

2. ПРОЦЕДУРА СБОРА АНАЛИЗИРУЕМОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Предпочтительным является сбор спермы путём мастурбации. Образец спермы должен быть эякулирован в чистую ёмкость с широким горлышком, изготовленную из стекла или пластика, из лота, который был подтверждён как нетоксичный для сперматозоидов⁴.

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Рекомендуется проводить тест в день эякуляции, при условии, что образцы хранятся при температуре 2-8°C.

4. СБОР, ОБРАБОТКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сбор спермы должен происходить не ранее чем через 2 дня и не позднее чем через 7 дней полового воздержания путём мастурбации⁴. Тест должен быть выполнен в течение 1 дня после эякуляции. До проведения испытаний образец следует хранить при температуре 2-8°C.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Пероксидаза, присутствующая в гранулах некоторых лейкоцитов, окисляет 4-хлор-1-нафтол (4CN) до сине-фиолетового осадка 4-хлор-1-нафтона, используя H_2O_2 как окислитель. Реагент 4, содержит контр-окрашивающий раствор для облегчения дифференциации между пероксидаза-положительными и пероксидаза-отрицательными круглыми клетками.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

- Пероксидаза-положительные круглые клетки: содержат (синие-чёрные) гранулы, и их цитоплазма антрацитово-серая. Антрацитово-серая область может покрывать всю клетку или её часть.
- Пероксидаза-отрицательные круглые клетки: остаются неокрашенными или могут быть окрашены в розовый. Гранулы, которые видны в неокрашенных клетках, не окружены типичным антрацитово-серым цветом, наблюдаемым в положительных клетках.

КОЛИЧЕСТВО АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Набор был разработан для 120 анализов максимум. Рабочий раствор может использоваться для 22 x 2 последовательных дней анализа для максимума 60 анализов за один день тестов и общим количеством анализов за все дни тестов равным 120.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

В независимом валидационном исследовании разными лаборантами были проанализированы 44 образца (содержащих > 1 миллиона круглых клеток на мл) с использованием LeucoScreen и LeucoScreen Plus.

Рабочие характеристики:

1. Диапазон определения концентрации вещества: ограничений по минимальной или максимальной концентрациям пероксидаза-положительных круглых клеток, которые могут быть измерены, нет
2. Точность: Оба набора дали сравнимые результаты по анализу Пассинга-Бэблока.
3. Прецизионность: Оба набора могут дифференцировать пероксидаза-положительные и -отрицательные круглые клетки со сравнимой степенью достоверности (LeucoScreen Plus: CV_{intra} : 12%; CV_{inter} : 10%)
4. Значения концентрации вещества: нормальный образец спермы не должен содержать более 5×10^6 пероксидаза-положительных лейкоцитов /мл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Диапазон измерений: ограничений по минимальной или максимальной концентрациям пероксидаза-положительных круглых клеток, которые могут быть измерены, нет

Перевод с английского языка на русский язык

2. Внутрианалитический (Повторяемость)	коэффициент	вариации	<15%
3. Межаналитический (Воспроизводимость)	коэффициент	вариации	<15%

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Рекомендуется использование перчаток. Реагент 1 содержит метанол: избегайте вдыхания паров. Реагент 2 содержит H_2O_2 : коррозионное вещество, вызывает ожоги. После контакта с кожей немедленно промойте этот участок водой и мылом. Надевайте защитные очки / маску, медицинские перчатки. Все образцы спермы считаются потенциально заразными. Со всеми образцами следует обращаться так, как если бы через них может передаваться ВИЧ или гепатит. Всегда используйте свежие наконечники пипеток для предотвращения перекрестной контаминации. Не выбрасывайте продукт в окружающую среду.

ПРОВЕРКА ПЕРЕД НАЧАЛОМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Реагент 1 должен содержать прозрачную жидкость, не используйте набор, если жидкость стала желтой.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Мы рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачайте по ссылке с нашего интернет-сайта или просканируйте QR-код):



- Посчитайте количество круглых клеток при определении концентрации сперматозоидов в течение стандартного анализа спермы. Рассчитайте и запишите общую концентрацию круглых клеток в миллионах на миллилитр, так как это понадобится для расчёта концентрации пероксидаза-положительных белых кровяных клеток.
 - LeucoScreen Plus показан, если концентрация круглых клеток превышает 1×10^6 на мл.
 - Подготовьте рабочий раствор: Добавьте Реагента 1 - 200 мкл, Реагента 2 - 5 мкл и Реагента 3 - 1 мл в пробирку Эппендорф и тщательно перемешайте. Этот рабочий раствор стабилен в течение 48 часов, если хранить его при температуре 2-8°C в защищенном от (солнечного) света месте.
 - Возьмите 10 мкл образца спермы и добавьте 20 мкл рабочего раствора. Тщательно перемешайте.
 - Выдерживайте в течение двух минут при комнатной температуре в темноте.
 - Поместите 10 мкл смеси в середину предметного стекла микроскопа и добавьте 10 мкл Реагента 4. Тщательно перемешайте краем покровного стекла.
 - Накройте покровным стеклом.
 - Подсчитайте и классифицируйте круглые клетки общим количеством 200 штук при 400-кратном увеличении. Просканируйте различные поля зрения микроскопа (желательно 20).
- Примечание:** в случае некоторых образцов спермы вы, возможно, посчитаете нужным увеличить концентрацию круглых клеток для облегчения подсчета. Для этого процентифугируйте образец в течение 15 минут при 350g и ресуспендируйте осадок.
- В случае очень высокой концентрации круглых клеток также возможно развести образец в среде FertiCult Flushing.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗА-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БЕЛЫХ КРОВЯНЫХ КЛЕТОК

- Рассчитайте пропорцию пероксидаза-положительных клеток по следующей формуле:

ПРОПОРЦИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КРУГЛЫХ КЛЕТОК =

$$\frac{\text{Количество ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ круглых клеток}}{(\text{Кол-во ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ круглых клеток} + \text{Кол-во ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ круглых клеток})}$$

- Теперь рассчитайте концентрацию пероксидаза-положительных белых кровяных клеток в образце спермы по следующей формуле:

КОНЦЕНТРАЦИЯ (млн/мл) =

Пропорция положительных круглых клеток x общая концентрация круглых клеток

Пример:

- Общая концентрация круглых клеток - 2 млн/мл (определена в ходе анализа на концентрацию сперматозоидов)
- При помощи набора LeucoScreen Plus 120 круглых клеток идентифицированы как положительные и 80 - как отрицательные
- Пропорция положительных круглых клеток = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$
- Концентрация пероксидаза-положительных белых кровяных клеток = $0,6 \times 2 \text{ млн/мл} = 1,2 \text{ млн/мл}$

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЯ

Храните реагенты при температуре 2°C-25°C. Возможна транспортировка или краткосрочное хранение при повышенной температуре (до 5 дней при 37°C). Не подвержайте заморозке. Храните в защищенном от (солнечного) света месте. Набор стабилен в течение не менее 12 месяцев с даты производства (даже после вскрытия). Не используйте после истечения срока годности, указанного на этикетке. Всегда держите флаконы плотно закрытыми. Рабочий раствор можно хранить до 48 часов при 2-8°C в защищенном от (солнечного) света месте.

Изделия, хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный тест является вспомогательным инструментом при диагностировании мужского бесплодия, и, как и в случае с другими биологическими тестами, интерпретация результатов должна осуществляться в рамках клинической картины и данных сбора анамнеза. LeucoScreen Plus окрашивает только пероксидаза-положительные БКК, прочие типы БКК (напр., лимфоциты и моноциты) им не обнаруживаются. С другой стороны, имеются данные о том, что преобладающей формой лейкоцитов в образцах спермы человека являются пероксидаза-положительные лейкоциты.

УТИЛИЗАЦИЯ

При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно - эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами".

После использования набора, просроченные и неиспользованные реагенты относятся к классу Б и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Упаковка набора реагентов (коробки) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется вместе с бытовыми отходами.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Изготовитель гарантирует, что продукция соответствует требованиям, заявленным изготовителем, при условии соблюдения правил использования, транспортировки и хранения.

При возникновении вопросов по качеству медицинского изделия следует обращаться к уполномоченному представителю на территории Российской Федерации: ООО «ФерроТраст», Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 8 оф. 411.

УПАКОВКА

Наборы LeucoScreen Plus упакованы в картонные коробки.

КОДЫ ЗАКАЗА ПРОДУКЦИИ

REF

LEUCO_PLUS

МАРКИРОВКА



Для диагностики in vitro



Маркировка соответствия нормам ЕС



Номер по каталогу



Код партии



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изготовления



Изготовитель



Использовать до...



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Символ добровольной сертификации в РФ

ЕРМАКОВА Н. А.



Окислитель



Легковоспламеняющаяся жидкость



Едкое вещество



Опасное/раздражающее вещество



Опасность для органов дыхания/серьезная угроза здоровью



Острая токсичность

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Волфф Х., Андерсон Д. Дж. (1988) Иммунологическая категоризация и квантификация субпопуляции лейкоцитов в человеческой сперме. Фертильность и стерильность, 49(3): 497-504
2. Эйткин Р. Дж., Уэст К. М. (1990) Анализ соотношения между продукцией активных форм кислорода и проникновением лейкоцитов во фракции человеческой спермы, разделенные на градиенты плотности Percoll. Международный журнал андрологии, 13 (6):433-51.
3. Барратт К. Л. Р., Болтон А. Э., Кук И. Д. (1990) Функциональная значимость белых кровяных телец в мужских и женских половых путях. Репродукция человека, 5(6):639-44.
4. Лабораторное руководство ВОЗ по изучению и обработке человеческой спермы, 5-е издание (2010 г.), стр. 102-107.
5. Эйткин Р. Дж., Кларксон Дж. С., Фишель С. (1989) Генерация активных форм кислорода, перекисное окисление липидов и функция спермы человека. Биология репродукции, 41(1):183-7.
6. Хилл Дж. А., Хаймовичи Ф., Политч Дж. А., Андерсон Д. Дж. (1987) Влияние растворимых продуктов активированных лимфоцитов и макрофагов (лимфокинов и монокинов) на параметры подвижности сперматозоидов человека. Фертильность и стерильность, 47(3):460-5.
7. Йоханиссон Э., Кампана А., Лути Р., де Агостини А. (2000) Оценка «круглых клеток» в анализе спермы: сравнительное исследование. Новости репродукции человека, 6(4):404-12.
8. Волфф Х. (1995). Биологическая значимость белых кровяных телец в сперме. Фертильность и стерильность. 63:1143.
9. Шарма Р. К., Паскуалотто А. Э., Нельсон Д. Р., Томас А. Дж., Агарвал А. (2001). Соотношение между количеством белых кровяных телец в сперме и оксидативного стресса у мужчин, проходящих лечение в клинике лечения бесплодия. Журнал андрологии: 22: 573-583.
10. Пунаб М., Лойвукене К., Кермес К., Мандар Р. (2003). Предел лейкоцитоспермии с микробиологической точки зрения. Андролоджика; 35:271-278.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ



FertiPro N.V. (ФертиПро Н.В.), Индустриепарк Норд 32,
8730 Бирнем, Бельгия.

Веб: <http://www.fertipro.com>

Эл. почта: info@fertipro.com

УПОЛНОМОЧЕННЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ В РОССИИ

ООО «ФерроТраст», ул. Карла Маркса, д. 8
офис 411, 620026, Екатеринбург,
Россия, тел.: 8(343) 269-40-45, 261-60-29,
эл. почта: flust96@mail.ru



Перевод с английского языка на русский язык выполнен мной, переводчиком Ермаковой Надеждой Алексеевной.
Идентичность перевода подтверждаю.

Подпись переводчика

Ермакова Надежда Алексеевна

Российская Федерация
Город Екатеринбург Свердловской области
Восемнадцатого ноября две тысячи девятнадцатого года

Я, Пономарева Фанья Равельевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Екатеринбурга Филипповой Ольги Владимировны, свидетельствую подлинность подписи переводчика Ермаковой Надежды Алексеевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшей документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 66/201-п/66-2019-20-450.

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 540 руб. 00 коп.



Ф.Р.Пономарева

Лицензия № 341 выдана 27.12.2001 года Главным управлением Министерства юстиции Российской Федерации по Свердловской области. Адрес нотариальной конторы г Екатеринбург, ул 8 Марта д. 7. тел 8-982-754-43-98, 371-89-72.

