LeucoScreen Plus

Semiquantitatives Kit für die histochemische Bestimmung Peroxidase-positiver weißer Blutzellen in menschlichem Sperma

Dokument-ID: FP09 I111 R01 B.1

Aktualisierungsdatum: 22/12/2022

Zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum
Reagenz nur für den professionellen Gebrauch

ALGEMEINE INFORMATIONEN

Menschliches Ejakulat enthält meistens Leukozyten, bei denen es sich überwiegend um Peroxidase-positive Granulozyten handelt[1,2,3,4]. Eine übermäßige Anzahl dieser Zellen (Leukozytospermie) kann auf das Vorliegen einer Infektion der Fortpflanzungsorgane hindeuten. Eine Leukozytospermie kann auch mit Störungen im Spermaprofil im Zusammenhang stehen (Verminderung der Spermienmotilität und DNA-Integrität, Steigerung der Spermienviskosität sowie Verlust der Spermienfunktion als Folge von oxidativem Stress und/oder Sekretion zytotoxischer Zytokine durch diese weißen Blutzellen)[5,6]. Leukozytospermie ist zwar keine absolute Indikation für Unfruchtbarkeit, liegt aber bei durchschnittlich 10 bis 20 % aller unfruchtbaren Männer vor[7].

Der Weltgesundheitsorganisation zufolge gilt das Vorhandensein von mehr als einer Million Peroxidase-positiver weißer Blutzellen (LEU) pro ml Ejakulat als auffällig und wird als „Leukozytospermie“ bezeichnet[4]. Dieser Grenzwert ist allerdings strittig und wird mitunter als zu hoch oder zu niedrig erachtet. Es wurden Grenzwerte von $0{,}2 \times 10^6$ – 2×10^6 berichtet[7-9].

Wenn der Grenzwert von einer Million Peroxidase-positiven LEU pro ml Ejakulat überschritten wird, sollten mikrobiologische Tests durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob eine Infektion der Zusatzdrüse vorliegt. Die Beurteilung von Zusatzdrüsenmarkern kann außerdem nützliche Informationen über die normale Funktion der Nebenhoden (EpiScreen Plus, FertiPro NV), der Samenbläschen (Fructose Test, FertiPro NV) oder der Prostata liefern. Es ist zu beachten, dass das Nichtvorhandensein von Leukozyten die Möglichkeit einer Infektion der Zusatzdrüse nicht ausschließt.

VORGESEHENE VERWENDUNG

LeucoScreen Plus ist ein semiquantitatives, nicht automatisiertes, histochemisches Diagnose-Kit für die Bestimmung Peroxidase-positiver weißer Blutzellen in menschlichem Sperma.

Anstelle von Angaben zur Anzahl von Tests, die mit dem LeucoScreen Plus-Kit durchgeführt werden können, ist das Kit während der Lebensdauer des Kits für 40 Tagesansätze ausgelegt (es können 20 Arbeitslösungen hergestellt werden, die für 2 aufeinanderfolgende Tage stabil sind).

IM TEST ENTHALTENES MATERIAL

Reagenz 1 – 6 ml Substratlösung (4-CN in Methanol)

Reagenz 2 – 300 µl 30% Wasserstoffperoxid

Reagenz 3 – 22 ml Pufferlösung

Reagenz 4 – 1,2 ml Lösung zum Gegenfärben

Ein Analysezertifikat und das Materialsicherheitsdatenblatt sind auf Anfrage erhältlich oder können von unserer Website (www.fertipro.com) heruntergeladen werden.

BENÖTIGTES MATERIAL, DAS NICHT IM TEST ENTHALTEN IST

Mikroskop-Objektträger, Deckgläschen, Teströhrchen (Eppendorf), Pipetten, Hellfeldmikroskop.
Hinweis: Es wird empfohlen, ein Lichtmikroskop und kein Phasenkontrast-mikroskop zu verwenden, da letzteres zu Interpretationsschwierigkeiten führen könnte.

TESTPRINZIP

Bei einer typischen Spermaanalyse lassen sich weiße Blutzellen nur sehr schwer von anderen Rundzelltypen in der Spermaprobe (zum Beispiel von spermatogenen Zellvorstufen[10]) unterscheiden. LeucoScreen Plus nutzt die intrinsische Peroxidaseaktivität bestimmter weißer Blutzellen und kann daher zur Differenzierung der peroxidase-positiven weißen Blutzellen (z. B. polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen) in einer menschlichen Samenprobe von anderen Arten von Rundzellen verwendet werden.

In Gegenwart von Reagens 2 (H_2O_2) oxidiert die Myeloperoxidase in der Leukozytengranula das Reagens 1 (4-CN) zu einer bläulich-violetten Präzipitation (4-Chlor-1-naphton). Reagenz 4 enthält eine Lösung zum Gegenfärben, um die Unterscheidung zwischen Peroxidase-positiven Rundzellen und Peroxidase-negativen Rundzellen zu erleichtern.

METHODE

Wir empfehlen dringend, vor der ersten Verwendung des LeucoScreen Plus-Kit, das Schulungsprogramm durchzulesen und sich unser Demo-Video anzusehen, die beide auf unserer Website verfügbar sind.

Oder laden Sie das Video mittels den QR-Code:

PROBENTYP

Der Test sollte mit frischen menschlichen Spermaproben mit mehr als 1×10^6 Rundzellen pro ml durchgeführt werden.

PROBENENTNAHME

Bei der Spermagewinnung durch Masturbation sollten standardmäßige Spermaprobenbehälter verwendet werden, in der Regel aus Polypropylen, die auf das Überleben der Spermien bzw. auf Spermienmotilität getestet wurden. Wenn eine Spermagewinnung durch Masturbation nicht möglich ist, sollten nicht spermatoxische Kunststoffkondome verwendet werden. Lassen Sie den Spermaprobenbehälter auf Raumtemperatur kommen, bevor Sie die Spermaprobe hinzufügen, um große Temperaturänderungen zu vermeiden, die sich auf die Spermatozoen auswirken können. Der Test sollte am selben Tag der Gewinnung der Spermaprobe durchgeführt werden.

WARNHINWEISE, DIE VOR DER BENUTZUNG ZU BEACHTEN SIND

Verwenden Sie das Produkt nicht, wenn der Verschluss der Flaschen bei der Lieferung des Kits geöffnet oder defekt ist.

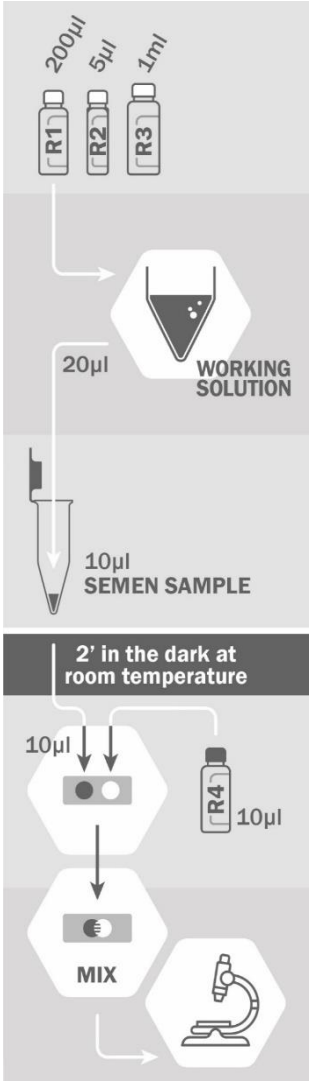
VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Reagenz 1 sollte eine farblose Flüssigkeit enthalten, verwenden Sie das Kit nicht, wenn die Flüssigkeit gelb ist.

METHODE

1. Zählen Sie die Anzahl der Rundzellen, während die Spermienkonzentration bei der Routineanalyse des Spermas bestimmt wird. Berechnen Sie die Gesamtkonzentration der Rundzellen in Mio./ml und notieren Sie sich den Wert, da dieser für die Berechnung der Konzentration der Peroxidase-positiven weißen Blutzellen benötigt wird.
   Wenn die Konzentration der Rundzellen über 1×10^6 pro ml liegt, führen Sie den LeucoScreen Plus-Test durch.
2. Bereiten Sie die Arbeitslösung vor: Geben Sie die folgenden Volumina in ein Eppendorf-Röhrchen und mischen Sie diese gründlich.
   - 200 µl Reagenz 1
   - 5 µl Reagenz 2
   - 1 ml Reagenz 3

   Diese Arbeitslösung ist bei Aufbewahrung bei 2 bis 8 °C 48 Stunden stabil, geschützt vor (Sonnen-) licht.
3. Geben Sie 20 µl Arbeitslösung zu 10 µl Spermaprobe. Gründlich mischen.
4. Inkubieren Sie die Mischung zwei Minuten bei Raumtemperatur **im Dunkeln**.
5. Überführen Sie 10 µl der Mischung in die Mitte eines Mikroskop-Glasobjektträgers und geben Sie 10 µl Reagenz 4 dazu. Mischen Sie mithilfe der Kante eines Deckgläschens gründlich durch.
6. Legen Sie das Deckgläschen darauf.
7. Zählen Sie bei 400-facher Vergrößerung insgesamt 200 Rundzellen. Scannen Sie verschiedene Mikroskopfelder (vorzugsweise 20).
8. Alle verwendeten Reagenzien und Materialien nach jedem Test entsorgen.



Hinweis: In manchen Spermaproben muss die Konzentration der Rundzellen unter Umständen erhöht werden, um die Zellzählung zu vereinfachen. Zentrifugieren Sie in einem solchen Fall die Probe 15 Minuten bei 350 g. Entfernen Sie vorsichtig das überstehende Volumen der Samenprobe und resuspendieren Sie das Pellet.

Bei einer sehr hohen Konzentration von Rundzellen (d. h. über 20×10^6 pro ml) wird dringend empfohlen, die Probe in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder in FertiCult™ Flushing Medium zu verdünnen.

INTERPRETATION

- Peroxidase-positive Rundzellen: enthalten (bläulich-)schwarze Granula und weisen ein anthrazitgraues Zytoplasma auf. Dieser anthrazitfarbene Bereich kann die komplette Zelle oder lediglich einen Teil davon überlagern.
- Peroxidase-negative Rundzellen: bleiben ungefärbt oder können rosafarben sein. Anders als bei positiven Zellen sind die Granula in ungefärbten Zellen nicht von der typischen Anthrazitfarbe umgeben.

BERECHNUNG DER KONZENTRATION DER PEROXIDASE-POSITIVEN WEIßEN BLUTKÖRPERCHEN

- Berechnen Sie den Anteil peroxidase-positiver Zellen wie folgt:

$$\text{ANTEIL POSITIVER RUNDZELLEN} = \frac{\text{Anzahl der POSITIVEN Rundzellen}}{(\text{Anzahl der POSITIVEN Rundzellen} + \text{Anzahl der NEGATIVEN Rundzellen})}$$

- Berechnen Sie nun die Konzentration der peroxidase-positiven weißen Blutkörperchen in der Spermaprobe wie folgt:

KONZENTRATION (mill/ml) =
Anteil positiver Rundzellen x Gesamtkonzentration Rundzellen

Beispiel:

- Die Gesamtkonzentration der Rundzellen beträgt 2 mill/ml (ermittelt bei der Spermakonzentrationsanalyse)
- Mit dem LeucoScreen Plus-Test werden 120 Rundzellen als positiv befunden und 80 Rundzellen als negativ
- Anteil positiver Rundzellen = $120/((120+80))$ = 0,6
- Konzentration der peroxidase-positiven weißen Blutkörperchen = 0,6 x 2 mill/ml = 1,2 mill/ml

EINSCHRÄNKUNGEN DER METHODE

Dieser Test hilft bei der Diagnostizierung männlicher Infertilität. Wie bei anderen biologischen Tests auch muss die Interpretation der Ergebnisse innerhalb des Rahmens klinischer Befunde und der Anamnesedaten erfolgen. Der LeucoScreen Plus-Test färbt nur Peroxidase-positive Leukozyten, andere Arten (z. B. Lymphozyten und Monozyten) werden nicht nachgewiesen.

LEISTUNGSMERKMALE

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: VKintra < 15 %, VKinter < 15 %

Positive prozentuale Übereinstimmung: 88 % – Negative prozentuale Übereinstimmung: 96 %

LAGERUNG / ENTSORGUNG

- Das Kit ist mindestens 12 Monate ab Herstellungsdatum stabil (auch geöffnet).
- Das Kit nach Ablauf des auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Lagern Sie die Reagenzien bei 2 °C bis 25 °C.
- Nicht einfrieren.
- Vor (Sonnen-)licht schützen.
- Die Flaschen müssen stets fest verschlossen gehalten werden.
- Die Arbeitslösung kann bis zu 48 Stunden bei 2 bis 8 °C und geschützt vor (Sonnen-) licht aufbewahrt werden.
- Geeignet für Transport oder kurzfristige Lagerung bei erhöhten Temperaturen (bis zu 5 Tage bei 37 °C).
- Die Reagenzien müssen in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften zur Entsorgung von Medizinprodukten entsorgt werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Es ist ratsam, Handschuhe zu tragen.

Reagenz 1 enthält Methanol: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar, Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen, Schädigt die Organe

Reagenz 2 enthält H_2O_2: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen, Verursacht schwere Augenschäden. Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

Reagenz 3 enthält ProClin 950: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden, Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Alle Spermaproben sollten als potenziell infektiös betrachtet werden. Alle Proben sind daher so zu behandeln, als könnten sie HIV oder Hepatitis übertragen. Bei jedem Schritt frische Pipettenspitzen verwenden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Das Produkt nicht in die Umwelt entsorgen.

Auftretende schwerwiegende Vorkommnisse (nach der Definition der EU-Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika) sollten an FertiPro NV und ggf. an die zuständige Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Nutzer und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.

BIBLIOGRAPHIE

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, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021
5. Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biology of Reproduction, 41(1):183-7.
6. Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A., Anderson, D.J. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. Fertility and Sterility, 47(3):460-5.
7. Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. Fertil Steril. 63;1143.
8. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. J. Androl: 22: 573-583.
9. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. Andrologica; 35:271-278.
10. 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.

KUNDENDIENST-TECHNISCHER SUPPORT

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

CE 2797

IVD

REF LEUCO_PLUS

SYMBOLERLÄUTERUNG

Symbole gemäß Definition in ISO 15223			
REF	Bestellnummer	LOT	Chargencode
	Vor Sonnen-Licht schützen		Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten		Verfalldatum
IVD	In-vitro-Diagnostik	°C °C	Temperaturgrenze
Symbol gemäß der Definition in IVDR 2017/746			
CE 2797	CE-gekennzeichnet durch die Benannte Stelle 2797		
Symbol gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 [CLP]			
	GHS08 Ernste Gesundheitsgefahr		GHS07 Gesundheitsgefahr
	GHS02 Entzündbare Flüssigkeit		GHS05: Verätzung/Reizung der Haut
	GHS06 Akute Toxizität		