



LeucoScreen Plus

Semi-kwantitatieve kit voor de histochemische bepaling van peroxidase-positieve witte bloedcellen in humaan sperma

IVD

Document referentie: FP09 I111 R01 B.2
Update: 14/05/2024

MATERIAAL INBEGREPEN

Catalogusnummer
LeucoScreen Plus

LEUCO_PLUS	LeucoScreen Plus – 40 days of analysis
------------	--

KLANTEN-TECHNISCHE ONDERSTEUNING

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



LeucoScreen Plus

Enkel voor in vitro diagnostisch gebruik
Reagentia enkel voor professioneel gebruik

ALGEMENE INFORMATIE

De meeste humane ejaculaten bevatten leukocyten (waarvan het merendeel peroxidase-positieve granulocyten zijn)⁽¹⁻⁴⁾. De aanwezigheid van excessieve aantallen van deze cellen (leukocytospermie) kan indicatief zijn voor een infectie van het reproductief stelsel. Leukocytospermie kan ook geassocieerd zijn met afwijkingen van het spermastaal (daling in motiliteit en DNA integriteit, verhoging van de viscositeit, alsook dysfunctionele spermatozoa ten gevolge van oxidatieve stress en/of cytotoxische cytokines die gesecreteerd worden door de leukocyten)^(5, 6). Hoewel leukocytospermie geen absolute indicator van infertiliteit is, wordt deze conditie vastgesteld in gemiddeld 10 tot 20% van alle onvruchtbare mannen⁽⁷⁾.

De aanwezigheid van meer dan 1 miljoen peroxidase-positieve witte bloedcellen per ml ejaculaat wordt volgens de WHO (World Health Organization) als abnormaal beschouwd en wordt benoemd als "Leucocytospermia"⁽⁴⁾. Deze limiet staat echter nog ter discussie: sommigen vinden deze waarde te laag, terwijl anderen deze net te hoog vinden. Limieten tussen 0.2 x10⁶ – 2x10⁶ werden gerapporteerd⁽⁷⁻⁹⁾.

Voor spermastalen met meer dan 1 miljoen peroxidase-positieve witte bloedcellen per ml ejaculaat is het aangewezen om te onderzoeken of er een infectie is van de secretaire organen van het voortplantingsstelsel d.m.v. microbiologische testen. Daarenboven kunnen bepaalde markers in het seminaal plasma nuttige additionele informatie leveren i.v.m. het functioneren van de bijbal (EpiScreen Plus, FertiPro NV), zaadblaasjes (Fructose Test, FertiPro NV), of prostaat. Belangrijk te vermelden is dat de afwezigheid van peroxidase-positieve witte bloedcellen de mogelijkheid voor een infectie van bovenvermelde klieren niet uitsluit.

BEOOGD GEBRUIK

LeucoScreen Plus is een semi-kwantitatieve, niet-geautomatiseerde, histochemische en diagnostische kit voor de bepaling van peroxidase-positieve witte bloedcellen in humaan sperma.

Het aantal testen dat uitgevoerd kan worden met de LeucoScreen Plus kit is niet gespecificeerd. De kit bevat voldoende reagentia voor 40 "test" dagen gedurende de houdbaarheid van de kit (er kunnen 20 werkoplossingen

worden aangemaakt, die elk stabiel zijn voor 2 opeenvolgende dagen).

MATERIAAL INBEGREPEN BIJ DE TEST

Reagens 1 – 6 ml Substraat oplossing (4-CN in methanol)
Reagens 2 – 300 µl 30% Waterstofperoxide
Reagens 3 – 22 ml Buffer oplossing
Reagens 4 – 1.2 ml Tegenkleuring

Een certificaat van analyse en MSDS zijn beschikbaar op aanvraag of kunnen worden gedownload van de website (www.fertipro.com).

BENODIGD MATERIAAL, NIET INBEGREPEN

Objectglaasjes, dekglaasjes, test tubes (Eppendorf), pipetten, lichtmicroscop.

Opmerking: *het wordt aangeraden gebruik te maken van een lichtmicroscop en niet van een fase contrast microscoop, aangezien deze tot interpretatie-moeilijkheden zou kunnen leiden.*

PRINCIPE VAN DE TEST

Wanneer een standaard sperma analyse wordt uitgevoerd, is het heel moeilijk om te differentiëren tussen witte bloedcellen en andere types van rondcellen in een spermastaal (zoals bijvoorbeeld immature spermatozoa⁽¹⁰⁾). LeucoScreen Plus maakt gebruik van de intrinsieke peroxidase activiteit van bepaalde witte bloedcellen en kan daardoor worden gebruikt om onderscheid te maken tussen peroxidase-positieve witte bloedcellen (bv. polymorfonucleaire (PMN) granulocyten en macrofagen) en andere soorten rondcellen in een humaan spermastaal.

In de aanwezigheid van Reagens 2 (H₂O₂) zal myeloperoxidase, aanwezig in de granulen van witte bloedcellen, Reagens 1 (4-CN) oxideren tot een blauwpaarse neerslag (4-chloro-1-naphton). Reagens 4 bevat een tegenkleuring om gemakkelijker het onderscheid te maken tussen peroxidase-positieve en -negatieve rondcellen.

METHODE

Alvorens de kit voor de eerste maal te gebruiken, raden wij ten eerste aan het Excel training programma en een nuttige demonstratievideo te bekijken die beschikbaar zijn op onze website. De video kan ook gedownload worden door onderstaande QR-code te scannen:



Type staal

De test moet uitgevoerd worden op een vers humaan spermastaal dat meer dan 1x10⁶ rondcellen per milliliter bevat.

Staalname

Wanneer het sperma door masturbatie wordt verkregen, moeten standaard spermacontainers worden gebruikt, meestal vervaardigd uit polypropyleen, die getest zijn op de overleving/beweeglijkheid van het sperma. Wanneer de afname van sperma door masturbatie niet mogelijk is, moeten niet-sequentoxische plastic condooms worden gebruikt. Houd de spermacontainer op kamertemperatuur voordat het spermastaal wordt toegevoegd om grote temperatuurschommelingen te voorkomen die de spermatozoa kunnen beïnvloeden. De test dient binnen dezelfde dag na spermacollectie te worden uitgevoerd.

Waarschuwingen voor gebruik

Het product niet gebruiken wanneer de verzegeling van de flessen is geopend of defect is wanneer de kit geleverd wordt.

Vorbereiding van het reagens

Reagens 1 moet een heldere vloeistof bevatten, gebruik de kit niet wanneer de vloeistof geel is geworden.

Method

- Tel het aantal rondcellen tijdens het bepalen van de spermaconcentratie in routine sperma onderzoek. Bereken en noteer de totale concentratie rondcellen in miljoen/ml. Deze waarde zal later nodig zijn om de concentratie peroxidase-positieve witte bloedcellen te berekenen.
Indien de concentratie rondcellen meer dan 1 miljoen/ml bedraagt, is het aangewezen om de LeucoScreen Plus test uit te voeren.
- Bereid een werkoplossing door volgende volumes toe te voegen in een Eppendorf tube en grondig te mengen.
 - 200 µl Reagens 1
 - 5 µl Reagens 2
 - 1 ml Reagens 3Deze werkoplossing is stabiel gedurende 48 uur wanneer deze bewaard wordt tussen 2-8°C, beschermd van (zon)licht.
- Neem 10µl van het spermastaal en voeg 20µl van de werkoplossing toe. Meng grondig.
- Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur, **in het donker**.
- Breng 10µl van deze mix op het midden van een objectglaasje en voeg 10µl toe van Reagens 4. Meng de

twee druppels grondig, gebruik makend van de hoek van het dekglasje.

6. Dek het mengsel af met het dekglasje.
7. Tel en classificeer 200 rondcellen op een 400x vergroting. Scan verschillende microscopovelden (bij voorkeur minstens 20).
8. Na elke individuele test moeten alle gebruikte reagentia en materialen worden weggegooid.

Opmerking: In sommige spermastalen kan het nuttig zijn om de rondcel concentratie aan te rijken om het tellen gemakkelijker te maken. Dit kan door het staal te centrifugeren gedurende 15 minuten aan 350g, een hoeveelheid semen boven de pellet te verwijderen en het pellet te resuspendieren.

In het geval van een zeer hoge rondcel concentratie (i.e. meer dan 20×10^6 per ml), wordt het sterk aangeraden om het staal te verdunnen in PBS of in FertiCult™ Flushing medium.

INTERPRETATIE

- Peroxidase-positieve rondcellen: bevatten (blauwachtig-)zwarte granulen en hebben een antraciet-grijs cytoplasma. Deze antraciet kleuring kan de volledige cel in beslag nemen, of enkel een deel van de cel.
- Peroxidase-negatieve rondcellen: kleuren niet of kleuren roze. Granulen die te zien zijn in ongekleurde cellen zijn niet omgeven door de typische antraciet-kleuring in positieve cellen.

BEREKENING VAN DE CONCENTRATIE PEROXIDASE-POSITIEVE WITTE BLOEDCELLEN

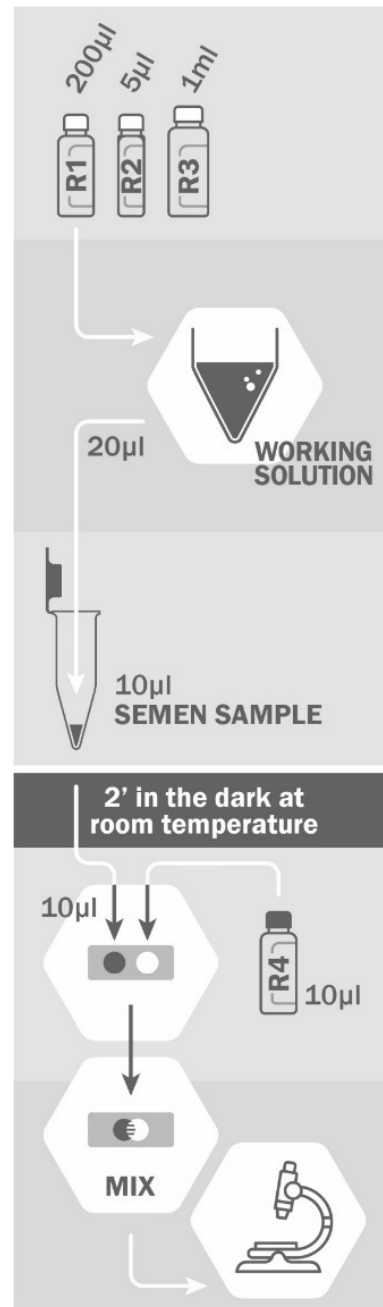
- Bereken de proportie peroxidase-positieve cellen als volgt:

$$\text{PROPORTIE POSITIEVE RONDCELLEN} = \frac{\text{"Aantal POSITIEVE rondcellen"}}{\text{"Aantal POSITIEVE rondcellen + Aantal NEGATIEVE rondcellen"}}$$

- Bereken nu de concentratie peroxidase-positieve witte bloedcellen in het spermastaal als volgt:

$$\text{CONCENTRATIE POSITIEVE RONDCELLEN (miljoen/ml)} = \text{Proportie positieve rondcellen} \times \text{totale concentratie rondcellen}$$

Grafische weergave van het protocol:



Voorbeeld:

- Totale concentratie rondcellen is 2 miljoen/ml (vastgesteld tijdens sperma concentratiebepaling)
- Met de LeucoScreen Plus test worden 120 rondcellen positief bevonden en 80 rondcellen negatief.
- Proportie positieve rondcellen = $120 / (120 + 80) = 0.6$
- Concentratie peroxidase-positieve witte bloedcellen = $0.6 \times 2 \text{ miljoen/ml} = 1.2 \text{ miljoen/ml}$

BEPERKINGEN VAN DE METHODE

Deze kit is een hulpmiddel in de diagnose van mannelijke infertiliteit en, zoals met alle biologische testen, moeten de resultaten geïnterpreteerd worden binnen het kader van een breder (klinisch) onderzoek en patiëntgegevens. De LeucoScreen Plus test kleurt enkel peroxidase-positieve witte bloedcellen, andere types witte bloedcellen (bv. lymfocyten en monocyten) worden niet onderscheiden van overige rondcellen.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Procent positieve overeenkomst: 88% - procent negatieve overeenkomst: 96%

BEWAARCONDITIES / AFVALINSTRUCTIES

- De kit is stabiel tot minstens 12 maanden na productiedatum (zelfs na openen).
- Gebruik de kit niet na de vervaldatum die vermeld staat op de verpakking.
- Bewaar de reagentia tussen 2 en 25°C.
- Niet invriezen.
- Vermijd blootstelling aan (zon)licht.
- De flessen moeten na gebruik steeds goed dichtgedraaid worden.
- De werkoplossing kan tot 48 uur bewaard worden bij 2-8°C (bewaar in het donker).
- Reagentia moeten worden afgevoerd in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften voor de afvoer van medische hulpmiddelen.

VOORZORGEN

Het is aangeraden om handschoenen te dragen.

Reagens 1 bevat methanol: licht ontvlambare vloeistof en damp, giftig bij inslikken, bij contact met de huid en bij inademing. Veroorzaakt schade aan organen.

Reagens 2 bevat H_2O_2 : schadelijk bij inslikken en bij inademing, veroorzaakt ernstig oogletsel. Draag oog- en gezichtsbescherming.

Reagens 3 bevat ProClin 950: veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel, kan een allergische huidreactie veroorzaken.

Alle spermastalen moeten beschouwd worden als mogelijks infectieus. Behandel stalen alsof ze HIV of hepatitis zouden kunnen overdragen. Gebruik steeds verse pipettips voor elke stap in het proces om kruisbesmetting te voorkomen. Vernietig de kit volgens nationale richtlijnen.

Elk ernstig incident (zoals gedefinieerd in de "Europese regelgeving voor in-vitro diagnostiek 2017/746") dat zich heeft voorgedaan moet worden gerapporteerd aan FertiPro NV en, indien van toepassing, aan de competente autoriteit van het EU lidstaat waar de gebruiker en/of patiënt is gevestigd.

BIBLIOGRAFIE

1. Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril.* 1988;49(3):497-504.
2. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl.* 1990;13(6):433-51.
3. Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod.* 1990;5(6):639-48.
4. Geneva: World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021; sixth edition.
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183-97.
6. Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril.* 1987;47(3):460-5.
7. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1143-57.
8. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
9. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
10. Johanisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update.* 2000;6(4):404-12.

SYMBOLEN WOORDENLIJST

Symbolen zoals gedefinieerd in ISO 15223-1



Catalogusnummer



Lotnummer



Raadpleeg de
gebruiksaanwijzing



Fabrikant



In Vitro Diagnostiek



Temperatuurslimiet



Vervaldatum



Uit de buurt van zonlicht
houden

Symbolen zoals gedefinieerd in IVDR 2017/746



CE-markering door Notified
Body 2797

Symbolen zoals gedefinieerd in Verordening (EC) Nr. 1272/2008 [CLP]



GHS08
Ernstig gevaar voor de
gezondheid



GHS02
Ontvlambare vloeistof



GHS06
Acute toxiciteit



GHS07
Gevaar voor de gezondheid



GHS05
Huidcorrosie/-irritatie