

LeucoScreen Plus



Semi-kwantitatieve kit voor de histochemische bepaling van peroxidase-positieve witte bloedcellen in humaan sperma
Ref. doc: FP09 I111 R01 A.4 Update: 1/02/2021
Enkel voor in vitro diagnostisch gebruik – Reagentia enkel voor professioneel gebruik

INLEIDING

De meeste humane ejaculaten bevatten leukocyten (waarvan het merendeel peroxidase-positieve granulocyten zijn)^{1,2,3,4}. De aanwezigheid van excessieve aantallen van deze cellen (vb. 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). Hoewel leukocytospermie geen absolute indicator van infertiliteit is, wordt deze conditie vastgesteld in gemiddeld 10 tot 20% van alle onvruchtbare mannen⁸.

Wanneer een standaard sperma analyse wordt uitgevoerd, is het heel moeilijk om te differentiëren tussen granulocyten en andere types van rondcellen in een spermastaal (zoals bijvoorbeeld immature spermatozoa⁷). Een relatief snelle en goedkope manier om peroxidase-positieve witte bloedcellen te onderscheiden van andere rondcellen in sperma, maakt gebruik van de intrinsieke peroxidase-activiteit van deze cellen⁷. LeucoScreen Plus is, net zoals LeucoScreen, gebaseerd op deze techniek en kan daarom gebruikt worden om peroxidase-positieve witte bloedcellen aan te kleuren in sperma.

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 0.2×10^6 – 2×10^6 werden gerapporteerd⁸⁻¹⁰.

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.

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 AANWEZIG IN DE KIT

- 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 de website (www.fertipro.com).

MATERIAAL NIET AANWEZIG IN DE KIT

Objectglasjes, dekglasjes, 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 interpretatiemoelijkheden zou kunnen leiden.

TYPE STAAL

De test moet uitgevoerd worden op een vers humaan spermastaal dat meer dan 1 miljoen rondcellen per milliliter bevat. De test moet uitgevoerd worden op de dag van ejaculatie.

PRINCIPE VAN DE TEST

Myeloperoxidase, aanwezig in de granulen van bepaalde witte bloedcellen, oxideert 4-CN naar het blauw-purpere 4-chloro-1-naphthon precipitaat, en maakt hierbij gebruik van H₂O₂ als oxidant. Reagens 4 bevat een tegenkleuring om gemakkelijker het onderscheid te maken tussen peroxidase-positieve en -negatieve rondcellen.

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.

PERFORMANTIE

44 humane spermastalen werden geanalyseerd door verschillende operatoren in een onafhankelijke validatiestudie. Hierbij werd de LeucoScreen Plus test vergeleken met de LeucoScreen test. De volgende eigenschappen van de LeucoScreen Plus test werden bepaald:

- **Accuraatheid:** beide kits leverden gelijkaardige resultaten gebaseerd op een Passing Bablok analyse.
- **Precisie:** beide kits kunnen het onderscheid maken tussen peroxidase-positieve en -negatieve rondcellen met een gelijkaardige precisie (LeucoScreen Plus: CV_{intra}: 12%; CV_{inter}: 10%)

CONTROLE VOOR GEBRUIK

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

METHODE

Alvorens de kit voor de eerste maal te gebruiken, raden wij ten zeerste 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 in te scannen:



1. Tel het aantal rondcellen tijdens het bepalen van de spermacentratie 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.
2. 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.
3. Neem 10µl van het spermastaal en voeg 20µl van de werkoplossing toe. Meng grondig.
4. Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur, **in het donker**
5. Breng 10µl van deze mix op het midden van een objectglasje 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 met een 400x vergroting. Scan verschillende microscoopvelden (bij voorkeur minstens 20).

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 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.

BEREKENING VAN DE CONCENTRATIE PEROXIDASE-POSITIEVE WITTE BLOEDCELLEN

- Bereken de proportie peroxidase-positieve cellen als volgt:

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

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

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

- 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 = $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
 - Concentratie peroxidase-positieve witte bloedcellen = 0.6×2 miljoen/ml = 1.2 miljoen/ml

Bewaarcondities en stabiliteit

Bewaar de reagentia tussen 2-25°C. De kit kan getransporteerd en kortstondig bewaard worden bij hogere temperaturen (tot 5 dagen op 37°C). Niet invriezen. Vermijd blootstelling aan (zon)licht. 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. 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).

BEPERKINGEN

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. lymfocyt en monocyt) worden niet onderscheiden van overige rondcellen.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGEN

Het is aangeraden om handschoenen te dragen. Reagens 1 bevat methanol: vermijd inhalatie van dampen. Reagens 2 bevat H₂O₂: corrosief, veroorzaakt brandwonden. Na contact met de huid, onmiddellijk wassen met water en zeep. Draag oog- en gezichtsbescherming. 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 vermijden. Vernietig de kit volgens nationale richtlijnen.

BIBLIOGRAFIE

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. Johannisson 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.



FertiPro nv, Industriepark Noord 32,
8730 Beernem, België.
URL: <https://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com



LEUCO_PLUS

