



# LeucoScreen Plus

## Semikvantitativt histokjemisk sett for bestemmelse av peroksidasepositive hvite blodlegemer i menneskelig sæd

IVD

Dokument-ID: FP09 I111 R01 B.2  
Oppdatering: 14/05/2024

### MATERIALE INKLUDERT

#### Katalognummer

##### LeucoScreen Plus

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

#### TEKNISK KUNDESTØTTE

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

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

### GENERELL INFORMASJON

De fleste menneskelige ejakulater inneholder leukocytter, og den dominerende formen for leukocytter i menneskelig sæd er peroksidase-positive granulocytter<sup>(1-4)</sup>. Overdreven forekomst av disse cellene (leukocytospermi) kan indikere at det foreligger en infeksjon i reproduktionsorganene. Leukocytospermi kan også være forbundet med defekter i sædprofilen (reduisert sædcellemotilitet og DNA-integritet, økt sædviskositet, samt tap av sædcellefunksjon som følge av oksidativt stress og/eller utskillelse av cytotoxicke cytokiner fra disse hvite blodcellene)<sup>(5, 6)</sup>. Selv om leukocytospermi ikke er en absolutt indikasjon på infertilitet, observeres denne tilstanden i gjennomsnitt hos 10 til 20 % av alle infertile menn<sup>(7)</sup>.

I følge Verdens helseorganisasjon (WHO) anses forekomsten av mer enn én million peroksidase-positive hvite blodlegemer (WBC) per ml ejakulat som unormalt og er merket som «leukocytospermi»<sup>4</sup>. Denne terskelverdien er imidlertid omdiskutert, da noen mener at den er for lav, mens andre mener at den er for høy. Faktisk er terskelnivåer fra  $0,2 \times 10^6$  til  $2 \times 10^6$  blitt rapportert<sup>(7-9)</sup>.

Når terskelen på én million peroksidasepositive hvite blodlegemer per ml ejakulat overskrides, bør det utføres mikrobiologiske tester for å undersøke om det foreligger en ekstra kjertelinfeksjon. Vurdering av ekstra kjertelmarkører kan gi ytterligere nyttig informasjon om riktig funksjon av bitestikkelen (EpiScreen Plus, FertiPro NV), sædblæreene (fruktosetest, FertiPro NV) eller prostata. Noe som er viktigere, er at fraværet av leukocytter ikke utelukker muligheten for en ekstra kjertelinfeksjon.

### TILTENKT FORMÅL

LeucoScreen Plus er et semi-kvantitativt, ikke-automatisert, histokjemisk og diagnostisk sett for bestemmelse av peroksidase-positive hvite blodlegemer i menneskelig sæd.

Antall tester som kan utføres med LeucoScreen Plus-settet, er ikke spesifisert. I stedet er settet designet for 40 dagers analyse i løpet av settets levetid (20 arbeidsløsninger kan lages, som er stabile i 2 påfølgende dager).

### INKLUDERT MATERIALE I TESTEN

Reagens 1 – 6 ml substratløsning (4-CN i metanol)

Reagens 2 – 300 µl 30 % hydrogenperoksid

Reagens 3 – 22 ml bufferløsning

Reagens 4 – 1.2 ml motfargeløsning

Analysesertifikat og sikkerhetsdatablad MSDS er tilgjengelig etter forespørsel eller kan lastes ned fra nettstedet vårt (www.fertipro.com).

### MATERIALE SOM KREVES, MEN IKKE ER INKLUDERT

Objektglass, dekkglass, reagensrør (Eppendorf), pipetter, lysfeltmikroskop.

**Merknad:** Det anbefales å bruke lysmikroskop og ikke bruke fasekontrastmikroskop, siden sistnevnte kan føre til tolkningsvansker.

### TESTPRINSIPP

Når en typisk sædanalyse utføres, er det svært vanskelig å skille hvite blodceller fra andre typer runde celler i sædprøven (for eksempel spermatogene stamceller<sup>(10)</sup>). LeucoScreen Plus benytter seg av den iboende peroksidaseaktiviteten til enkelte hvite blodceller og kan derfor brukes til å differensiere de peroksidase-positive hvite blodcellene (f.eks. polymorfonukleære (PMN) granulocytter og makrofager) i en menneskelig sædprøve fra andre typer runde celler.

I nærvær av reagens 2 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vil myeloperoksidasen i leukocytgranuler oksidere reagens 1 (4-CN) til et blålig bunnfall (4-klor-1-nafton). Reagens 4 inneholder en motfargeløsning for å lette differensieringen mellom peroksidase-positive runde celler og peroksidase-negative runde celler.

### METODE

Før første gangs bruk av LeucoScreen Plus-settet, anbefaler vi på det sterkeste å følge opplæringsprogrammet og se demonstrasjonsvideoen vår. Begge er tilgjengelig på nettstedet vårt. Videoen kan også lastes ned ved å skanne følgende QR-kode:



### Prøvetyper

Testen bør utføres på ferske menneskelige sædprøver som inneholder mer enn  $1 \times 10^6$  runde celler per ml.

### Prøveinnsamling

Standard sædoppsamlingsbeholdere bør brukes, vanligvis i polypropylen, og det bør testes for spermoverlevelse/sædmotilitet når sæd samles ved

masturbasjon. Ikke-sædgiftige plastkondomer bør brukes når sædinnsamling ved masturbasjon frarådes. Oppbevar sædoppsamlingsbeholderen ved romtemperatur før tilsetning av sædprøven for å unngå store temperaturrendringer, noe som kan påvirke sædcellene. Testen bør utføres innen samme dag som sædprøven.

### Advarsel før bruk

Ikke bruk produktet hvis flaskeforseglingen er brutt eller defekt når settet blir levert.

### Klargjøring av reagens

Reagens 1 skal inneholde en klar væske, ikke bruk settet hvis væsken har blitt gul.

### Metode

- Tell antall runde celler mens du finner sædkonsentrasjonen under rutinemessig sædanalyse. Beregn og skriv ned totalkonsentrasjonen av runde celler i ml/ml, siden dette vil være nødvendig for beregning av konsentrasjonen peroksidase-positive hvite blodceller. Når konsentrasjonen av runde celler overstiger  $1 \times 10^6$  per ml, er LeucoScreen Plus-testen indikert.
  - Klargjør arbeidsløsning: Tilsett følgende volumer til et Eppendorf-rør og bland grundig.
    - 200 µl reagens 1
    - 5 µl reagens 2
    - 1 ml reagens 3
 Denne arbeidsløsningen er stabil i 48 timer ved lagring mellom 2–8°C, beskyttet mot (sol)lys.
  - Ta 10 µl av sædprøven og tilsett 20 µl arbeidsløsning. Bland grundig.
  - Inkuber i to minutter ved romtemperatur i mørket.
  - Overfør 10 µl av blandingen til midten av et mikroskopglass og tilsett 10 µl reagens 4. Bland grundig ved å bruke kanten av dekkglasset.
  - Dekk til med dekkglasset.
  - Tell og klassifiser totalt 200 rundceller ved hjelp av 400x forstørrelse. Skann forskjellige mikroskopiske felt (helst 20).
  - Kast alle brukte reagenser og materialer etter hver enkelt test.
- Merknad:** I enkelte sædprøver foretrekker du kanskje å berike den runde cellekonsentrasjonen for å tilrettelegge for celletellingen. Sentrifuger derfor prøven i 15 minutter ved 350 g, fjern noe volum av sædprøven og fordel pelleten på nytt.

Ved svært høy konsentrasjon av runde celler (dvs. over  $20 \times 10^6$  per ml) anbefales det sterkt å fortynne prøven i PBS eller i FertiCult™ Flushing medium.

## TOLKNING

- Peroksidase-positive runde celler: Inneholder (blåaktige) svarte granuler og har et antrasittgrå cytoplasma. Dette antrasittområdet kan dekke hele cellen eller bare deler av den.
- Peroksidase-negative runde celler: Forblir ufarget eller kan være rosafarget. Granuler i ufargede celler er ikke omgitt av den typiske antrasittfargen som ses i positive celler.

## BEREGNING AV KONSENTRASJON AV PEROKSIDASE-POSITIVE HVITE BLODCELLER

- Calculate the proportion of peroxidase-positive cells as follows: Beregn andelen av peroksidase-positive celler på følgende måte:

$$\frac{\text{ANDEL POSITIVE RUNDE CELLER} = \text{Antall POSITIVE runde celler}}{\text{(Antall POSITIVE runde celler + antall NEGATIVE runde celler)}}$$

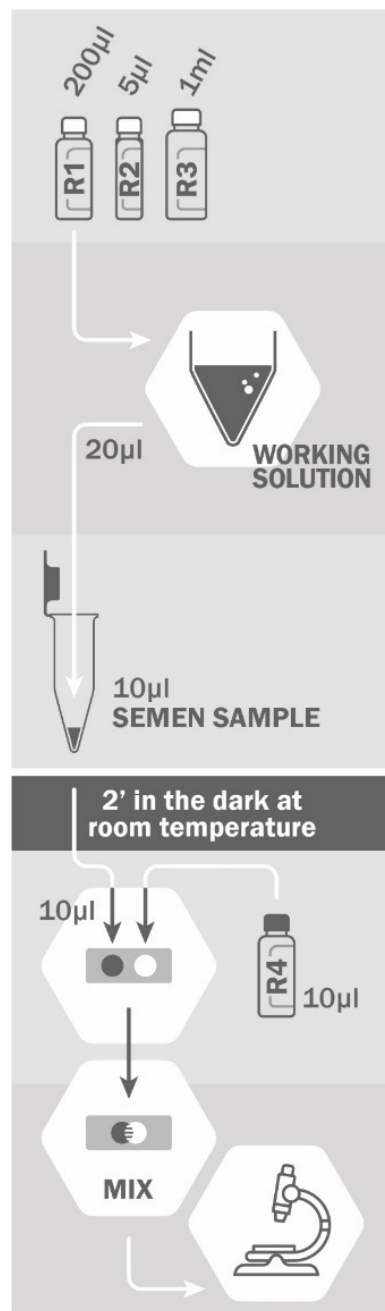
- Beregn nå konsentrasjonen av peroksidase-positive hvite blodlegemer i sædprøven på følgende måte:

$$\text{KONSENTRASJON (mil/ml)} = \text{Andel positive runde celler} \times \text{samlet konsentrasjon av runde celler}$$

Eksempel:

- Samlet konsentrasjon av runde celler er 2 mil/ml (bestemt under analyse av sædcellekonsentrasjon)
- Med LeucoScreen Plus-testen blir 120 runde celler funnet positive og 80 runde celler funnet negative
- Andel positive runde celler =  $\frac{120}{(120+80)} = 0.6$
- Konsentrasjon av peroksidase-positive hvite blodlegemer =  $0.6 \times 2 \text{ mil/ml} = 1.2 \text{ mil/ml}$

## Grafisk presentasjon av protokollen:



## METODENS BEGRENSNINGER

Denne testen er et hjelpemiddel ved diagnostisering av mannlig infertilitet, og som for andre biologiske tester må tolkning av resultatene utføres innenfor rammen av kliniske funn og data om anamnese. LeucoScreen Plus-testen farger kun peroksidase-positive WBC, andre typer WBC (f.eks. lymfocytter og monocytter) oppdages ikke.

## YTELSESEGENSKAPER

Repeterbarhet og reproducerbarhet:  $CV_{intra} < 15\%$ ,  $CV_{inter} < 15\%$

Prosent positiv enighet: 88%, Prosent negativ enighet: 96%

## OPPBEVARING/KASSERING

- Settet er stabilt i minst 12 måneder etter produksjonsdato (selv etter åpning).
- Må ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på produktetiketten.
- Oppbevar reagenser mellom 2°C og 25°C.
- Må ikke fryses.
- Beskytt mot (sol)lys.
- Flaskene skal holdes tett lukket til enhver tid.
- Arbeidsløsningen kan lagres opp til 48 timer ved 2–8°C, beskyttet mot (sol)lys.
- Reagensene må kasseres i henhold til lokale forskrifter for kassering av medisinsk utstyr

## FORHOLDSREGLER

Det anbefales å bruke hansker.

*Reagens 1* inneholder metanol: svært brannfarlig væske og damp, giftig ved svelging, i kontakt med hud eller innånding, forårsaker organskader.

*Reagens 2* inneholder  $H_2O_2$ : skadelig ved svelging eller ved innånding, forårsaker alvorlig øyeskade. Bruk øye-/ansiktsbeskyttelse.

*Reagens 3* inneholder ProClin 950: gir alvorlige hudforbrenninger og øyeskader, kan forårsake en allergisk hudreaksjon.

Alle sædprøver bør betraktes som potensielt smittsomme. Behandle alle prøver som om de kan overføre HIV eller hepatitt. Bruk alltid ferske pipettespisser for hvert trinn for å unngå krysskontaminering. Ikke kast produktet i miljøet.

Enhver alvorlig hendelse (som definert i European In Vitro Diagnostic Medical Device Regulation 2017/746) som har oppstått, skal rapporteres til FertiPro NV og, hvis aktuelt, til den relevante myndigheten i den EU-medlemsstaten brukeren og/eller pasienten er etablert.

## BIBLIOGRAFI

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. Johansson 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.

## SYMBOLORDLISTE

### Symboler som definert i ISO 15223



Katalognummer



Produksjonsnummer



Se bruksanvisningen



Produsent



In vitro-diagnostikk



Temperaturgrense



Holdbarhetsdato



Holdes borte fra sollys

### Symbol som definert i IVDR 2017/746



CE-merking av bemyndiget organ 2797

### Symbol som definert i forskrift (EC) nr. 1272/2008 [CLP]



GHS08  
Alvorlig helsefare



GHS02  
Brannfarlig væske



GHS06  
Akutt forgiftning



GHS07  
Helsefare



GHS05:  
Hudetsing/-irritasjon