

LeucoScreen Plus



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

Ref.-Dok.: FP09 I111 R01 A.3 Aktualisierung: 16.10.2019

In-vitro-Diagnostikum – Reagenz nur für den professionellen Gebrauch

EINFÜHRUNG

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. Beispielsweise mit einer Reduzierung der Ejakulatmenge, der Spermienkonzentration und der Motilität der Spermien, einem Verlust der Spermienfunktion infolge von oxidativem Stress^{2,5} und/oder der Sezernierung zytotoxischer Zytokine⁶. Leukozytospermie ist zwar keine absolute Indikation für Unfruchtbarkeit, liegt aber bei durchschnittlich 10 bis 20 % aller unfruchtbaren Männer vor.

Bei einer typischen Spermaanalyse lassen sich weiße Blutzellen nur sehr schwer von anderen Rundzelltypen in der Spermprobe (zum Beispiel von spermatogenen Zellvorstufen⁷) unterscheiden. Bei einer relativ schnellen und erschwinglichen Methode zur Differenzierung zwischen Peroxidase-positiven weißen Blutzellen und anderen Rundzellen einer Spermprobe macht man sich die intrinsische Peroxidase-Aktivität bestimmter weißer Blutzellen zunutze⁷. Auf dieser Technik beruht LeucoScreen Plus (analog zum LeucoScreen) und kann daher verwendet werden, um die Peroxidase-positiven weißen Blutzellen in einer menschlichen Spermprobe zu färben.

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“ bezeichnet⁴. Dieser Grenzwert ist allerdings strittig und wird mitunter als zu hoch oder zu niedrig erachtet. Es wurden Grenzwerte von $0,2 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ berichtet⁸⁻¹⁰.

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 (Zitronensäuretest, FertiPro NV) liefern. Es ist zu beachten, dass das Nichtvorhandensein von Leukozyten die Möglichkeit einer Infektion der Zusatzdrüse nicht ausschließt.

Anstelle von Angaben zur Anzahl von Tests, die mit dem LeucoScreen Plus-Kit durchgeführt werden können, ist das Kit für 40 Tagesansätze ausgelegt.

IM TEST ENTHALTENES MATERIAL

- Reagenz 1 – 6 ml Substratlösung (4-CN in Methanol)
- Reagenz 2 – 300 µl 30%iges Wasserstoffperoxid
- Reagenz 3 – 22 ml Pufferlösung
- Reagenz 4 – 1,2 ml Lösung zum Gegenfärben

Ein Analysezertifikat und das Materialsicherheitsdatenblatt sind auf unserer Website (www.fertipro.com) verfügbar.

IM TEST NICHT ENTHALTENES MATERIAL

Mikroskop-Objektträger, Deckgläschen, Teströhrchen (Eppendorf), Pipetten, Hellfeldmikroskop.

PROBENTYP

Der Test sollte mit frischen menschlichen Spermproben mit mehr als 1×10^6 Rundzellen pro ml durchgeführt werden, und am selben Tag der Gewinnung der Spermprobe durchgeführt werden.

TESTPRINZIP

Die in Granula bestimmter Leukozyten vorhandene Myeloperoxidase oxidiert 4-CN mit H_2O_2 als Oxidationsmittel zu 4-Chlor-1-naphthon, das als bläulich-violetter Niederschlag ausfällt. Reagenz 4 enthält eine Lösung zum Gegenfärben, um die Unterscheidung zwischen Peroxidase-positiven Rundzellen und Peroxidase-negativen Rundzellen zu erleichtern.

INTERPRETATION

- **Peroxidase-positiv 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-negativ Rundzellen:** bleiben ungefärbt oder können rosafarben sein. Anders als bei positiven Zellen sind die Granula in ungefärbten Zellen nicht von der typischen Anthrazitfarbe umgeben.

TESTLEISTUNG

In einer unabhängigen Validierungsstudie wurden 44 Proben (mit > 1 Million Rundzellen pro ml) von verschiedenen Anwendern mit LeucoScreen und LeucoScreen Plus analysiert. Leistungsmerkmale:

- **Genauigkeit:** Beide Kits lieferten vergleichbare Ergebnisse bei der Passing-Bablock-Analyse.
- **Präzision:** Beide Kits können zwischen Peroxidase-positiven und -negativen Rundzellen mit vergleichbarer Präzision unterscheiden (LeucoScreen Plus: VK_{intra} : 12 %; VK_{inter} : 10 %)

VOR BENUTZUNG ZU ÜBERPRÜFEN

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

METHODE

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

Oder laden Sie das Video mittels den Barcode:



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 200 µl Reagenz 1, 5 µl Reagenz 2 und 1 ml Reagenz 3 in ein Eppendorf-Röhrchen und mischen Sie diese gründlich. 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 Spermprobe. 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).

Hinweis: In manchen Spermproben 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 ist es auch möglich, die Probe in FertiCult™ Flushing medium zu verdünnen.

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 Spermprobe wie folgt:

$$\text{KONZENTRATION (mill/mL)} = \text{Anteil positiver Rundzellen} \times \text{Gesamtkonzentration Rundzellen}$$

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 = $\frac{120}{(120+80)} = 0,6$
- Konzentration der peroxidase-positiven weißen Blutkörperchen = $0,6 \times 2$ mill/mL = 1,2 mill/mL

LAGERUNG UND STABILITÄT

Lagern Sie die Reagenzien bei 2 °C bis 25 °C. Geeignet für Transport oder kurzfristige Lagerung bei erhöhten Temperaturen (bis zu 5 Tage bei 37 °C). Nicht einfrieren. Vor (Sonnen-)licht schützen. Das Kit ist mindestens 12 Monate ab Herstellungsdatum stabil (auch geöffnet). Das Kit nach Ablauf des auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden. 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.

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-positiv Leukozyten, andere Arten (z. B. Lymphozyten und Monozyten) werden nicht nachgewiesen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Es ist ratsam, Handschuhe zu tragen. Reagenz 1 enthält Methanol: Das Einatmen der Dämpfe vermeiden. Reagenz 2 enthält H₂O₂: ätzend, verursacht Verätzungen. Bei Berührung mit der Haut sofort mit Wasser und Seife abwaschen. Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. 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.

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, 5. Auflage (2010), S. 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.



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



LEUCO_PLUS

