

LeucoScreen

IVD

Dokumentenkenntung: FP09 I05 R01 B.13 Aktualisierung: 5.09.2018

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

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 vor⁸.

Bei einer typischen Spermaanalyse lassen sich weiße Blutzellen nur sehr schwer von anderen Rundzelltypen in der Spermaprobe (zum Beispiel von spermatogenen Zellvorstufen⁷) unterscheiden. Bei einer relativ schnellen und erschwinglichen Methode zur Differenzierung zwischen Peroxidase-positiven weißen Blutzellen und anderen Rundzellen einer Spermaprobe macht man sich die intrinsische Peroxidase-Aktivität bestimmter weißer Blutzellen zunutze⁷. Auf dieser Technik beruht LeucoScreen und kann daher verwendet werden, um die Peroxidase-positiven weißen Blutzellen in einer menschlichen Spermaprobe 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 $0,2 \times 10^6$ – 2×10^6 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-Kit durchgeführt werden können, ist das Kit für 20 Tagesansätze ausgelegt.

IM TEST ENTHALTENES MATERIAL

- Reagenz 1 - 20 ml LeucoScreen-Färbemittel (enthält: Benzidin, Cyanosin und Methanol)
- Reagenz 2 - 1 ml 3 %-iges Wasserstoffperoxid

Ein Analysezertifikat und das Materialsicherheitsdatenblatt können auf unserer Website (www.fertipro.com) heruntergeladen werden.

IM TEST NICHT ENTHALTENES MATERIAL

Glasobjektträger, Deckgläschen, Pipetten, Mikroskop.

TESTPRINZIP

Granula in den polymorphkernigen LEU enthalten Peroxidase. Peroxidase setzt Wasserstoffperoxid zu Wasser und freien Sauerstoffionen um, die wiederum Benzidin oxidieren. Oxidiertes Benzidin färbt sich braun, daher haben Peroxidase-positive Zellen eine braune Farbe. Reagenz 1 enthält außerdem eine rote Kontrastflüssigkeit zur Unterscheidung zwischen Peroxidase-positiven Rundzellen und Peroxidase-negativen Rundzellen.

INTERPRETATION

- **Peroxidase-positive** Rundzellen sind gelb bis braun/rötlichbraun gefärbt. Bei diesen handelt es sich um polymorphkernige weiße Blutzellen.
Hinweis: positive Zellen sind komplett oder teilweise gefärbt und weisen mitunter lediglich braune Flecken auf.
- **Peroxidase-negative** Rundzellen sind rosa gefärbt. Es gibt noch weitere Rundzellen (z. B. Spermatozoen, Peroxidase-negative weiße Blutzellen).

PROBENTYP

Natives verflüssigtes Sperma mit mehr als 1×10^6 Rundzellen pro ml.

METHODE¹¹

1. Zählen Sie die Anzahl der Rundzellen, während die Spermienkonzentration bei der Routineanalyse des Spermias 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 höher als 1×10^6 pro ml liegt, führen Sie den LeucoScreen-Test durch.
2. Bereiten Sie die Arbeitslösung **unter einer Abzugshaube** zu (Reagenz 1 ist giftig):

Geben Sie 30 µl Reagenz 2 zu 1 ml Reagenz 1 und mischen Sie gründlich. Diese Arbeitslösung bleibt 1 Tag lang stabil.

3. Mischen Sie 1 Tropfen (10 µl) Sperma mit 1 Tropfen (10 µl) Arbeitslösung mithilfe der Kante eines Deckgläschens. Mischen Sie gründlich mindestens 1 Minute lang.
4. Warten Sie 1 Minute. Legen Sie das Deckgläschen auf die Mischung. Luftbläschen vermeiden. Die Bildung kleiner Luftbläschen ist normal und auf die Peroxidasereaktion zurückzuführen. Je mehr Peroxidase-positive Zellen vorhanden sind, desto mehr Luftbläschen bilden sich. **Hinweis:** Bei übermäßig starker Bildung von Luftbläschen muss der Objektträger sofort gelesen werden.
5. Lesen Sie nach 2 Minuten mindestens 20 separate Mikroskopfelder aus und bestimmen Sie die Anzahl der „Peroxidase-positiven“ Rundzellen und die Anzahl der „negativen“ Rundzellen (siehe Abschnitt zur INTERPRETATION). Verwenden Sie eine 400-fache Vergrößerung.

Wir empfehlen, sich unser Demo-Video anzusehen (kann über den Link zu unserer Website: www.fertipro.com, oder durch Scannen des Barcodes heruntergeladen werden):



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:

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

Beispiel:

- Die Gesamtkonzentration der Rundzellen beträgt 2 mill/mL (ermittelt bei der Spermakonzentrationsanalyse)
- Mit dem LeucoScreen-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 = $0,6 \times 2 \text{ mill/mL} = 1,2 \text{ mill/mL}$

AUFBEWAHRUNG

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. Das Kit ist mindestens 12 Monate ab Herstellungsdatum stabil (auch geöffnet). Das Kit nach Ablauf des auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Die Arbeitslösung kann bis zu 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, im Dunkeln.

ANMERKUNGEN

Die Bildung eines Bodensatzes in Reagenz 1 ist normal. Gießen Sie Reagenz 1 einfach durch Filterpapier, um den Bodensatz zu entfernen. Falls die Gesamtkonzentration der Rundzellen in der Probe nicht ermittelt wurde (Auslassung von Schritt 1 im Abschnitt „Methode“, was nicht empfohlen wird!), kann die Konzentration der peroxidase-positiven weißen Blutkörperchen anhand der Anzahl dieser Zellen pro mikroskopisches Feld berechnet werden. Dazu ist es **wichtig, dass das genaue Volumen der in einem mikroskopischen Feld untersuchten Spermamischung berücksichtigt wurde**. Dieses in µl ausgedrückte Volumen wird wie folgt berechnet:

- Messen Sie den Durchmesser eines mikroskopischen Feldes mit einem Mikrometer und berechnen Sie den Radius:
$$r = \text{Radius (mm)} = \left(\frac{\text{Durchmesser (µm)}}{2} \right) / 1000$$
- Berechnen Sie die Tiefe der Probe (= Abstand zwischen Gläsern):
$$T = \text{Tiefe (mm)} = \frac{\text{Volumen Sperma Mischung (20 µl)}}{\text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm) des Deck glases}}$$
- $V = \text{Volumen in einem mikroskopischen Feld (µl)} = \text{Tiefe} \times \text{Radius}^2 \times 3,14$

Untersuchen Sie mindestens 20 verschiedene mikroskopische Felder und ermitteln Sie die Anzahl peroxidase-positiver Rundzellen. Stellen Sie die folgenden Berechnungen an:

- $A = \text{durchschnittliche Anzahl der positiven Zellen pro mikroskopisches Feld}$
- $N = \text{Anzahl der positiven Zellen pro Spermamischung (Zellen/ml)} = \frac{A}{V} \times 10^3$
- Konzentration der peroxidase-positiven weißen Blutkörperchen in nativer Spermaprobe (Zellen/mL): $2 \times N$

Beispiel:

- Durchmesser des mikroskopischen Feldes = 250 µm → $r = 0,125 \text{ mm}$
- Deckglas = 24 x 40 mm → $D = [20 / (24 \times 40)] = 0,0208 \text{ mm}$
- $V = 0,0208 \times 0,125^2 \times 3,14 = 0,00102 \text{ µl}$

- 100 peroxidase-positieve witte bloedlichaampjes, geteld in 20 velden
→ A = 5
- $N = 5/0,00102 \times 10^3 = 4.900.000$ Zellen/ml
- Concentratie van peroxidase-positieve witte bloedlichaampjes in
natieve spermabeproeving (Zellen/mL) = $2 \times 4.900.000 = 9.800.000$
Zellen/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. LeucoScreen färbt nur Peroxidase-positiv LEU, andere Arten von LEU (z. B. Lymphozyten und Monozyten) können nicht nachgewiesen werden.

TESTLEISTUNG

Die Empfindlichkeit und Spezifität für Leukozytosperma betragen 90 % im Vergleich zum Immunhistochemietest¹², mit einem Grenzwert in Bezug auf die Peroxidase-Färbung von 1 Mio. LEU/ml und in Bezug auf den Immunhistochemietest von 2 Mio. LEU/ml. Das LeucoScreen-Kit kann zwischen Peroxidase-positiven und -negativen Rundzellen mit präzise unterscheiden (VKintra, VKinter <10 %).

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Alle Spermabeproevingen sollten als potenziell infektiös betrachtet werden. Alle Proben sind daher so zu behandeln, als könnten sie HIV oder Hepatitis übertragen.

Reagenz 1 ist bei Einatmen, Hautkontakt oder Verschlucken hochgiftig. Es besteht ein Risiko irreparabler Schädigung. Schutzkleidung tragen und verunreinigte Kleidung sofort ausziehen. Unter einem Abzug arbeiten. Bei einem Unfall einen Arzt hinzuziehen. Reagenz 2 ist ätzend und verursacht Verätzungen. Bei Berührung mit der Haut sofort mit Wasser und Seife abwaschen. Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-36.
2. Aitken, R.J., West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-51.
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*, 5:639-44.
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*, 41:183-7.
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*, 47:460-5.
7. 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.
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.
11. Endtz, A.W. (1972) Een methode om het vochtige urinesediment en het vochtige menselijke sperma rechtstreeks te kleuren. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 116(17): 681-5.
12. Politch, J.A., et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60(2): 372-5.

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

