

LeucoScreen

IVD

Document ID: FP09 I05 R01 B.13 Update: 5/09/2018

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

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 (leukocytospermie) kan indicatief zijn voor een infectie van het reproductief stelsel. Leukocytospermie kan ook geassocieerd zijn met afwijkingen van het spermastaaal, zoals een daling in ejaculaatvolume, verminderde concentratie en beweeglijkheid van sperma, alsook met dysfunctionele spermatozoa ten gevolge van oxidatieve stress^{2,5} en/of cytotoxische cytokines⁶ 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 spermastaaal zoals bijvoorbeeld spermatogene precursorcellen⁷. Een relatief snelle manier om peroxidase-positieve witte bloedcellen te onderscheiden van andere rondcellen in sperma, maakt gebruik van de intrinsieke peroxidase-activiteit van deze cellen⁷. LeucoScreen is gebaseerd op deze techniek en kan daarom gebruikt worden om peroxidase-positieve witte bloedcellen aan te kleuren in een humaan spermastaaal.

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 "Leucocytospermie"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 merkers 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 (Citric Acid, FertiPro NV). 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 kit is niet gespecificeerd. De kit bevat voldoende reagentia voor 20 "test" dagen.

MATERIAAL AANWEZIG IN DE KIT

- Reagens 1 - 20ml LeucoScreen kleurstof (Bevat: benzidine, cyanosine en methanol)
- Reagens 2 - 1ml 3% Waterstofperoxide

Een certificaat van analyse en de MSDS kunnen gedownload worden van onze website (www.fertipro.com).

MATERIAAL NIET AANWEZIG IN DE KIT

Objectglasjes, dekglasjes, pipetten, microscoop

PRINCIPE VAN DE TEST

Granulen in polymorfonucleaire WBC bevatten peroxidase. De peroxidase katalyseert waterstofperoxide in water en vrije zuurstofionen, die benzidine op hun beurt oxideren. Geoxideerde benzidine kleurt bruin en bijgevolg vertonen de peroxidase-positieve cellen een bruine kleur. Reagens 1 bevat een rode contrastvloeistof wat het onderscheid tussen de peroxidase-positieve rondcellen en de peroxidase-negatieve rondcellen vergemakkelijkt.

INTERPRETATIE

- **Peroxidase-positieve** rondcellen zijn geel tot bruin/bruinrood gekleurd. Dit zijn polymorfonucleaire witte bloedcellen.
Opmerking: positieve cellen zijn volledig of deels gekleurd, soms slechts te zien als bruine vlekjes/puntjes.
- **Peroxidase-negatieve** rondcellen zijn roze gekleurd. Dit zijn andere rondcellen (vb. spermatozoa, peroxidase-negatieve witte bloedcellen)

TYPE STAAL

Natief vervloeid sperma met meer dan 1×10^6 rondcellen per ml.

METHODE¹¹

1. Tel het aantal rondcellen bij het bepalen van de spermaconcentratie tijdens een routine sperma analyse. Bereken en noteer de totale concentratie rondcellen in miljoen/mL. Dit kan gebruikt worden tijdens de berekening van de concentratie aan peroxidase-positieve witte bloedcellen.

Wanneer de rondcelconcentratie meer dan 1×10^6 per ml bedraagt, is de LeucoScreen test aangeraden.

2. Maak de werkoplossing in een afzuigkast (Reagens 1 is giftig):

Voeg 30µl van Reagens 2 toe aan 1ml van Reagens 1 en mix grondig. Deze werkoplossing blijft stabiel gedurende 1 dag.

3. Mix 1 druppel (10µl) sperma met 1 druppel (10µl) werkoplossing. Maak gebruik van de rand van het dekglasje. Mix grondig voor ten minste 1 minuut.

4. Wacht 1 minuut. Plaats het dekglasje op het mengsel. Vermijd luchtbelletjes. De vorming van luchtbelletjes is normaal en een gevolg van de peroxidase reactie. Hoe hoger de concentratie van peroxidase-positieve cellen, hoe meer luchtbelletjes er zich zullen vormen. Opmerking: Bij een overmaat aan luchtbelletjes, evalueer de slide onmiddellijk.

5. Evalueer ten minste 20 aparte microscopische velden na 2 minuten en tel het aantal "peroxidase-positieve" rondcellen en het aantal "negatieve" rondcellen (zie Hoofdstuk INTERPRETATIE). Gebruik een 400x vergroting.

We raden aan om de demonstratie video te bekijken voordat je aan de test begint (download via link op onze website: www.fertipro.com, of scan de barcode):



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 spermastaaal 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 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 de 2°C en 25°C. De kit kan getransporteerd en kortstondig bewaard worden bij hogere temperaturen (tot 5 dagen op 37°C). Niet bevriezen. De kit is stabiel gedurende minstens 12 maanden na de productiedatum (zelfs na openen). Gebruik niet na vervaldatum zoals vermeld op het label. De werkoplossing kan tot 24 uur bewaard worden in het donker bij kamertemperatuur.

OPMERKINGEN

Sedimentvorming in Reagens 1 is normaal. Giet Reagens 1 over een filterpapier om het sediment te verwijderen.

Wanneer de totale rondcelconcentratie van het staal niet bepaald is geweest (Stap 1 van de methode niet uitgevoerd, wat we niet aanbevelen!), is het ook mogelijk om de concentratie peroxidase-positieve witte bloedcellen te berekenen op basis van het aantal dergelijke cellen per microscopisch veld.

Om dit zo te bepalen is het belangrijk dat het exacte volume van het spermamengsel beoordeeld in 1 microscopisch veld in rekening wordt gebracht. Dit volume, in µl, wordt berekend als volgt:

- Meet de diameter van 1 microscopisch veld met een micrometer en bereken de straal:
 $r = \text{straal (mm)} = \left(\frac{\text{diameter (µm)}}{2} \right) / 1000$
- Bereken de diepte van het staal (= afstand tussen de 2 glasjes):
 $D = \text{Diepte (mm)} = \frac{\text{Volume sperma mengsel (20µl)}}{\text{Lengte (mm)} \times \text{breedte (mm) van dekglasje}}$
- $V = \text{Volume in 1 microscopisch veld (µl)} = \text{Diepte} \times \text{Straal}^2 \times 3.14$

Beoordeel ten minste 20 verschillende microscopische velden en bepaal het aantal peroxidase-positieve rondcellen per veld. Voer de volgende berekeningen uit:

- $A = \text{gemiddelde aantal positieve cellen per microscopisch veld}$
- $N = \text{aantal positieve cellen per semen mixture (cellen/ml)} = \frac{A}{V} \times 10^3$
- Concentratie peroxidase-positieve WBC in natief spermastaaal (cellen/ml): $2 \times N$

Voorbeeld:

- Diameter van microscopisch veld = 250 µm → $r = 0.125$ mm
- Dekglasje = 24x40 mm → $D = [20/(24 \times 40)] = 0.0208$ mm
- $V = 0.0208 \times 0.125^2 \times 3.14 = 0.00102$ µl
- 100 peroxidase-positieve WBC geteld in 20 velden → $A = 5$

- $N = 5/0.00102 \times 10^3 = 4.900.000$ cellen/ml
- Concentratie peroxidase-positieve WBC in natief spermastaal (cellen/ml) = $2 \times 4.900.000 = 9.800.000$ cellen/ml.

BEPERKINGEN VAN DE METHODE

Deze test is een hulpmiddel bij de diagnose van mannelijke infertiliteit en, zoals bij andere biologische testen, moeten de resultaten geïnterpreteerd worden binnen het kader van een breder (klinisch) onderzoek en patiëntgegevens.

LeucoScreen kleurt enkel peroxidase-positieve WBC, andere types WBC (vb. Lymfocyt en monocyt) kunnen niet gedetecteerd worden.

PERFORMANTIE

Sensitiviteit en specificiteit voor leukocytospermie is 90% wanneer de LeucoScreen kit wordt vergeleken met de immunohistologische test¹², met een grenswaarde voor de peroxidase kleurstof van 1 miljoen WBC/ml en voor de immunohistologische test, 2 miljoen WBC/ml.

De LeucoScreen kit kan peroxidase-positieve en -negatieve rondcellen onderscheiden van elkaar met een inter- en intra-assay CV van minder dan 10%.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGEN

Alle spermastalen moeten beschouwd worden als mogelijks infectieus. Behandel alle stalen alsof ze HIV of hepatitis zouden kunnen overdragen. Reagens 1 is zeer giftig bij inademen, huidcontact of inslikken. Risico op onherstelbare schade. Draag beschermende kledij en doe gecontamineerde kleren onmiddellijk uit. Werk onder een afzuigkast. Bij een ongeval, zoek medische hulp. Reagens 2 is corrosief en veroorzaakt brandwonden. Na huidcontact was onmiddellijk met water en zeep. Draag oog- / gezichtsbescherming.

BIBLIOGRAFIE

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 leucocyte 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

 REF LEUCO

