



Medizinische Labordiagnostika Soukou

SemenLeu

(Semen Leucocyte Test/Spermien Leukozyten Test/)

MANUAL

GEBRAUCHSANWEISUNG

INSTRUCTIONS (EN RÉDACTION)

PAGE 2-3

SEITE 4-5



REF Art.-Nr. ZR103020
20 applications



IVD *in vitro diagnostics*



Manual

PLEASE READ CAREFULLY

SemenLeu

(Semen Leukocyte Test)

Professional use only

Application

The determination of leukocytes in seminal fluid serves as a marker for the functioning of the accessory sex glands. Leukocytes, especially polymorphic polynuclear leucocytes (PML), are present in most human ejaculates. By normal microscopy these cells can be morphologically easily mixed up with multi-nuclear spermatids. It is known that peroxidases are histochemically exclusively characteristic for the PM granulocytes.

Principle of method

By using hydrogen peroxide (H_2O_2) peroxidase-positive leukocytes (neutrophils polymorphic granulocytes) can be stained yellow to brown. Other cells (sperm, lymphocytes, monocytes, macrophages and multinucleated spermatids) remain unstained (peroxidase-negative).

With this kit the seminal fluid is treated with the reagents 1 and 2 in which only peroxidase stain-positive cells remain brown. These cells can be identified with a phase contrast microscope.

Storage and stability



2-8°C

24 months from date of manufacture. The work solution AB is usable after storage in the fridge until the next day.

Content

- Reagent 1 20 ml
- Reagent 2 1 ml

Necessary utensils

- Coverslips (18 x 18 mm)
- Wet-chamber
- Gloves
- Contrasting phase microscope
- Native ejaculate or washed sperm (100 µl)
- Slides
- Paper towels

- Pipettes and tips (10-100 and 100-1000 µl)
- Test tube (2 ml)
- Test tube holder
- Counting chamber

Preparation of work solution AB

Mix 1 ml of reagent 1 with 20 µl of reagent 2. In the case of studying more samples you have to calculate the appropriate amount of solution AB.

Procedure

1. Pipette 100 µl ejaculate in a test tube
2. Add 900 µl of solution AB
3. Mix gently solution AB and ejaculate (avoid foaming)
4. Incubating the mixture at room temperature 20-30 min
5. Repeat step 3
6. Pipette the mixture to a counting chamber. Put the counting chamber four minutes in a wet chamber to let sink all large cells

Evaluation objective: number of leukocytes in ejaculate

By microscopic view leukocytes are colored yellow to brown by peroxidases. The total number of peroxidase-positive cells per ejaculate can be calculated in one of the following options:

Known concentration of spermatozoa:

Count the peroxidase-positive cells and spermatozoa in at least 20 fields of view at 400x magnification. The concentration of the white blood cell is calculated using the following formula:
(Number of white blood cells / number of spermatozoa)
x sperm concentration (million / ml)

This method is only suitable for samples which contain more than 10 million sperm cells/ml.

Unknown concentration of spermatozoa:

In this case, the concentration of white blood cells is determined by multiplication by a factor which results

from the size of a field of view and the height of the distance between the counting chamber and the coverslip (or the depth of the semen sample). The diameter of a field of view can be measured by a micrometer. The surface area (s) corresponds to the square of the radius (r) multiplied by pi ($s = \pi r^2$).

Example: view field diameter = 250 μm , radius = 125 μm → area (s) = 49086 μm^2 .

The height between the slide and the coverslip can be calculated with the following formula: height [μm] = volume [μl] / (length [μl] x width [mm] of the coverslip).

Example: sample volume = 20 μl . Coverslip = 24 x 40 mm → height = 20/(24x40) = 0.0208 mm = 20.8 μm

The factor by which the concentration of white blood cells has to be multiplied is calculated from these values: Factor = 1,000,000 μm^3 (area x height)

Example: Factor = 1,000,000 μm^3 / (49086 μm^2 x 20.8 μm) = 0.98

For example, if five white blood cells in a field of view are counted it results by this factor a concentration of 4.9 million white blood cells per ml of ejaculate.

In fertile men the value of peroxidase-positive leukocytes is between 0.5×10^6 and 10^6 at a total leukocyte number (peroxidase-positive and peroxidase-negative cells) from 10^6 and 2×10^6 per ml of ejaculate [6].

Excessive presence of these cells (sperm-induced leukocytosis) can display a seed head infection. The sperm-induced leukocytosis can also be associated with a disturbance of the seed profile, including the reduction of semen volume, sperm concentration and sperm motility and a loss of sperm function as a result of oxidative stress [1, 2] or the secretion of cytotoxic cytokines.. It is therefore difficult to give an exact limit of the leukocyte concentration at which fertility is impaired. The influence of these cells depends on the place in the reproduction channel from where the leukocytes enter the sperm, the type of leukocytes and the degree of activation. If the seminal fluid contains more than 1×10^6 white cells per ml, the sample is to be tested microbiologically for gland infection.

Note: The absence of leukocytes does not exclude the possibility of glandular infection.

Safety information / precautions

(Please read also the safety data sheets)

- All semen samples should be considered potentially infectious. Handle with all samples like HIV or hepatitis infected material.
- When working with samples and reagents wear always protective clothing (gloves, gowns, eye / face protection).
- Reagent 1 contains *ortho*-toluidine, which is classified as carcinogenic. Skin contact or ingestion should be avoided.
- Reagent 2 contains hydrogen peroxide (H_2O_2). It is corrosive and toxic by inhalation. Skin contact or ingestion should be avoided.
- In case of an accident with reagent 1 and/or 2 contaminated clothing should take off immediately and consult a doctor.

References

1. Aitken RJ, West KM (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*, 13:433-451
2. Aitken RJ et al (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41:183-187
3. Barratt CLR et al (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5:639-644
4. Hill JA et al (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47:460-465
5. Politch JA et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60: 372-375
6. WHO Press (2010) laboratory manual for the examination and processing of human semen
7. Wolff, H, Anderson, DJ (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-536

REF Art.-Nr. ZR103020

20 Anwendungen



IVD *in vitro Diagnostika*

Gebrauchsanweisung

BITTE SORGFÄLTIG LESEN

SemenLeu (Spermien Leukozyten Test)



Nur für den professionellen Gebrauch

Anwendung

Die Leukozytenzahl-Bestimmung in Samenflüssigkeit dient als Marker für die Funktion der akzessorischen Sexualdrüsen. Leukozyten, vor allem polymorph kernige Leukozyten (PML), sind in den meisten humanen Ejakulaten vorhanden. Diese können beim normalen Mikroskopieren morphologisch leicht mit multinukleären Spermatiden verwechselt werden. Bekannt ist, dass Peroxidaseenzyme histochemisch ausschließlich charakteristisch für die PM-Granulozyten sind.

Prinzip der Methode

Durch den Einsatz von Wasserstoffperoxid, lassen sich Peroxidase-positive Leukozyten (neutrophile polymorphe Granulozyten) gelb bis braun färben. Andere Zellen (Spermien, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und multinukleäre Spermatiden) bleiben ungefärbt (Peroxidase-negative).

In diesem Test wird die Samenflüssigkeit mit den Reagenzien 1 und 2 behandelt, wobei sich lediglich Peroxidase-positive Zellen braun färben. Diese werden anschließend unter einem Phasenkontrastmikroskop identifiziert.

Lagerung und Haltbarkeit

2-8°C

24 Monate ab Herstellungsdatum. Die angesetzte AB-Lösung ist im Kühlschrank bis zum nächsten Tag verwendbar.

Inhalt (Lieferumfang)

- Reagenz 1 20 ml
- Reagenz 2 1 ml

Benötigte Utensilien (nicht im Lieferumfang enthalten)

- Deckgläser (18 x 18 mm)

- Feuchtkammer
- Handschuhe
- Mikroskop mit Phasenkontrast
- Nativejakulat oder gewaschene Spermien (100 µl)
- Objektträger
- Papiertücher
- Pipetten und Spitzen (10-100 und 100-1000 µl)
- Reagenzgefäß (2 ml)
- Reagenzgefäßständer
- Zählkammer

Vorbereitung der Arbeitslösung (AB):

Mischen Sie 1 ml von Reagenz 1 mit 20 µl von Reagenz 2. Sollten Sie bei der Untersuchung mehrere Proben aufarbeiten, müssen Sie die entsprechende Menge an AB ausrechnen.

Durchführung

1. 100 µl Ejakulat in ein Reagenzgefäß pipettieren
2. Zugabe von 900 µl AB-Lösung
3. Gut mischen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren (Schaumbildung vermeiden)
4. Inkubieren der Probe bei Raumtemperatur für 20-30 min
5. Schritt 3 wiederholen
6. Pipettieren Sie das Gemisch in eine Zählkammer. Stellen Sie die Zählkammer für vier Minuten in eine Feuchtkammer, um alle großen Zellen absinken zu lassen.

Auswertungsziel: Leukozytenzahl in Ejakulat

Leukozyten sind unter dem Mikroskop sind gelb bis braun gefärbt durch das Peroxidaseenzyme. Die Gesamtzahl Peroxidase-positiver Zellen pro Ejakulat lässt sich auf eine der folgenden Möglichkeiten berechnen:

Bekannte Konzentration an Spermatozoen:

Zählen Sie die Peroxidase-positiven Zellen und die Spermatozoen in mindestens 20 Blickfeldern bei 400x Vergrößerung aus. Die Konzentration der weißen Blutzellen wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{Anzahl wei}\beta\text{er Blutzellen} / \text{Anzahl Spermatozoen})}{\times \text{Spermienkonzentration (Mio./ml)}}$$

Diese Methode ist nur für Proben geeignet, die mehr als 10 Mio Spermien/ml enthalten.

Unbekannte Konzentration an Spermatozoen:

In diesem Fall wird die Konzentration der weißen Blutzellen durch Multiplikation mit einem Faktor ermittelt, der sich aus der Größe eines Blickfeldes und der Höhe des Abstands zwischen der Zählkammer und dem Deckglas (bzw. der Tiefe der Samenprobe) ergibt.

Der Durchmesser eines Blickfeldes kann mit einem Mikrometer gemessen werden. Der Flächeninhalt (s) entspricht dem Quadrat des Radius (r) multipliziert mit Pi ($s = \pi r^2$).

Bsp.: Blickfelddurchmesser = 250 µm, Radius = 125 µm → Flächeninhalt (s) = 49086 µm²

Die Höhe zwischen dem Objekträger und dem Deckglas kann mit folgender Formel berechnet werden: Höhe [µm] = Volumen [µl] / (Länge [mm] x Breite des Deckglases [mm])

Bsp.: Volumen der Probe = 20 µl. Deckglas = 24 x 40 mm →

$$\text{Höhe} = 20/(24 \times 40) = 0,0208 \text{ mm} = 20,8 \mu\text{m}$$

Der Faktor, mit dem die Konzentration der weißen Blutzellen multipliziert werden muss, errechnet sich aus diesen Größen wie folgt: Faktor = 1.000.000 µm³ (Flächeninhalt x Höhe)

Bsp.: Faktor = 1 000 000 µm³ / (49086 µm² x 20,8 µm) = 0,98

Wenn beispielsweise in einem Blickfeld 5 weiße Blutzellen gezählt werden, ergibt sich mit diesem Faktor eine Konzentration von 4,9 Millionen weißer Blutzellen pro ml Ejakulat.

Der Wert Peroxidase-positiver Leukozyten bei fertilen Männern liegt zwischen $0,5 \times 10^6$ und 10^6 bei einer Gesamtleukozytenzahl (Peroxidase-positive und Peroxidase-negative Zellen) zwischen 10^6 und 2×10^6 pro ml Ejakulat (WHO 2010).

Exzessives Vorkommen dieser Zellen (Leukozytospermie) kann eine Samenleiterinfektion anzeigen. Die Leukozytospermie kann auch mit einer Störung des Samenprofils einschließlich der Verminderung des Spermavolumens, der Spermien-konzentration und der Spermienbeweglichkeit einhergehen und einen Verlust der Spermienfunktion als Folge von oxidativem Stress (Aitken et al., 1989; Aitken und West, 1990) oder der Sekretion zytotoxischer

Zytokine anzeigen. Es ist daher schwierig, einen exakten Grenzwert der Leukozytenkonzentration anzugeben, ab dem die Fruchtbarkeit gestört ist. Der Einfluss dieser Zellen hängt von der Stelle im Reproduktionskanal ab, an der die Leukozyten in das Sperma gelangen, vom Typ der Leukozyten und deren Aktivierungsgrad.

Wenn die Samenflüssigkeit mehr als 1×10^6 weiße Blutkörperchen pro ml enthält, soll die Probe mikrobiologisch auf eine Drüseninfektion untersucht werden.

Hinweis: Das Fehlen von Leukozyten schließt die Möglichkeit einer Drüseninfektion nicht aus.

Sicherheitshinweise/Vorsichtsmaßnahmen

(Bitte lesen sie auch die Sicherheitsdatenblätter)

- Alle Samenproben sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie HIV oder Hepatitis übertragen könnten.
- Tragen Sie immer Sicherheitskleidung, wenn Sie mit Proben und Reagenzien arbeiten (Handschuhe, Kittel, Augen-/Gesichtsschutz).
- Das Reagenz 1 enthält Ortho Toluidin, das als krebsfördernd eingestuft wird. Hautkontakt oder Verschlucken sind zu vermeiden.
- Das Reagenz 2 enthält Wasserstoffperoxid (H_2O_2) das korrosiv wirkt und giftig beim Einatmen ist. Hautkontakt oder Verschlucken sind zu vermeiden.
- Kontaminierte Kleidung ist im Falle eines Unfalls mit den Reagenzien 1 und 2 sofort auszuziehen und einen Arzt aufzusuchen.

Referenzen

1. Aitken RJ, West KM (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*, 13:433-451
2. Aitken RJ et al. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41:183-187
3. Barratt CLR et al. (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5:639-644
4. Hill JA et al. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47:460-465
5. Politch JA et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60: 372-375
6. WHO Press (2010) laboratory manual for the examination and processing of human semen
7. Wolff, H, Anderson, DJ (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-536