

ENGLISH

1. Manufacturer

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
www.exbio.cz

2. Intended use

The SpermFlowEx[®] Kit is designed for analysis of following parameters in human semen using flow cytometry:

- **Sperm count**
- **Leukocyte count**
- **Sperm viability**
- **Sperm acrosome integrity**
- **Presence of intra-acrosomal protein in sperm**

The analysis should be completed by the examination of sperm motility and morphology using a light microscope in accordance to WHO recommendation [1].

3. Introduction

Lately, infertility of human population is a growing problem. Nearly 20 % of couples suffer from infertility, which is in 1/3 causes attributed to a male factor. Therefore, analysis of semen should play a role in basic non-invasive examination, which could verify or negate andrological cause of infertility.

Sperm examination is carried out mainly using the light microscope and obeys the WHO criteria from 2010 [1]. Such examination is subjective and depends on the personal experience of the examiner. When using the flow cytometry the analysis is balanced and objective, since the amount of measured sperms is much greater and detection of cells is provided via specific staining [2]. Main parameters having great impact on the ability of sperm to fertilize are: sperm count, sperm viability, acrosome integrity and presence of an intra-acrosomal protein (IAP) [3]. The acrosome contains digestive enzymes (including hyaluronidase and acrosin). These enzymes breakdown the outer membrane of the ovum called the zona pellucida, allowing the haploid nucleus of the sperm penetrate into the ovum. Presence of leukocytes in semen is a mark of an actual inflammation or a venereal disease.

4. Principle

Sperm count and leukocyte count

Measurement of the sperm count and leukocyte count is based on the addition of an internal standard (fluorescent beads with known concentration) to the semen sample. Detection of leukocytes in the sample is performed by staining with labeled antibody against human CD45 antigen (CD45 PE-Cy[™]5).

Sperm viability

Sperm viability is examined using propidium iodide which permeates through damaged membranes of dead cells and binds to their DNA.

Acrosome integrity

Measurement of acrosome integrity is based on the detection of an intra-acrosomal protein (IAP), which can be found inside the acrosome. If the sperm acrosome is intact, it is unable to detect IAP. Sperm with damaged membrane has IAP exposed and therefore accessible to the antibody against IAP, hence the protein is detected.

Presence of intra-acrosomal protein

After permeabilization of sperm membrane, intra-acrosomal protein is exposed to the antibody against intra-acrosomal protein (IAP) and thus is detected. In case, that sperm does not contain intra-acrosomal protein (IAP), the protein is not detected after permeabilization.

5. Precautions

- Intended for research use only.
- The flow cytometer should be calibrated on a routine basis using fluorescent microbeads to ensure stable sensitivity of detectors.
- Do not use reagents after expiration date stated on vial labels.
- Avoid prolonged exposure of the reagents to light.
- Avoid contamination of the reagents.
- Any non-performance of assay procedure may produce false results.
- Semen samples are considered as potentially infectious and must be handled with care.

Warning: The Permeabilizing Solution (ED7079-5) contains ethanol.

Warning



H-phrases

H226: Flammable liquid and vapour.

P-phrases

- P210: Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces.
No smoking.
- P260: Do not breathe vapours/spray.
- P280: Wear protective gloves / eye protection / face protection.
- P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON Center or doctor/physician if you feel unwell.
- P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
- P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
- P501 Dispose of contents/container to authorized facility for dangerous wastes.

6. Reagents provided

- ED7079-1 Intra-acrosomal protein FITC – 1 vial containing 0.5 ml of mouse monoclonal antibody against intra-acrosomal protein, FITC labeled.
- ED7079-2 CD45 PE-Cy™5 – 1 vial containing 0.25 ml of mouse monoclonal antibody against CD45, PE-Cy™5 labeled.
- ED7079-3 Fluorescent Count Standard – 1 vials containing 2 ml of fluorescent beads, 1×10^6 particles/ml
- ED7079-4 Propidium Iodide – 1 vials containing 0.25 ml of propidium iodide solution.
- ED7079-5 Permeabilizing Solution – 1 vials containing 25 ml of the reagent.

7. Storage

Store the SpermFlowEx® Kit at 2-8 °C. Expiration date is stated on vial labels and on the box.

8. Evidence of deterioration

In case of reagents deterioration or if data obtained show any performance alteration, please contact manufacturer using following e-mail address: technical@exbio.cz

9. Necessary material not supplied

- Suitable 5ml test tubes for blood staining (e.g. 12 × 75 mm)
- PBS buffer
- Automatic pipettes with disposable tips
- Vortex mixer
- Light microscope
- Centrifuge with rotor suitable for test tubes
- Flow cytometer - blue laser excitation at 488 nm and proper emission filters.

10. Specimen

Treat semen samples within 8 hours after ejaculation. Store semen samples at room temperature.

11. Assay procedure

Check the sperm count using a light microscope. Dilute the semen 1:1 or 1:9 with PBS according to the sperm count (the greater the count the greater the dilution).

Sperm and leukocyte count

1. Pipette 50 µl of diluted semen to a sample tube. Add 10 µl of **CD45 PE-Cy™5** reagent.
2. Mix the sample and incubate for 20 minutes at room temperature.
3. Add 50 µl of **Fluorescent Count Standard** (first drop well mixed standard in an empty microtube and then pipette the exact volume of the standard to the sperm sample).
4. Add 0.5 ml of PBS, mix the sample and analyze using a flow cytometer.

Sperm viability

1. Pipette 50 µl of diluted semen to a sample tube.
2. Add 10 µl of **Propidium Iodide** solution.
3. Mix the sample and incubate for 20 minutes at room temperature.
4. Add 0.5 ml of PBS, mix the sample and analyze using a flow cytometer.

Acrosome integrity

1. Pipette 50 µl of diluted semen to a sample tube.
2. Add 1 ml of PBS.
3. Mix well and centrifuge for 5 minutes at 150 g.
4. Wash the pellet twice (repeat the 2nd and 3rd step).
5. Add 10 µl of **Intra-acrosomal protein FITC** antibody to the pellet.
6. Mix the sample and incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Add 0.5 ml of PBS, mix well and analyze using a flow cytometer.

Presence of intra-acrosomal protein

1. Pipette 50 µl of diluted semen to a sample tube.
2. Add 1 ml of **Permeabilizing Solution** which **was allowed to warm up to room temperature** (20-25 °C).
3. Mix the sample and incubate for 15 minutes at room temperature.
4. Centrifuge for 5 minutes at 150 g.
5. Add 1 ml of PBS to the pellet, mix and centrifuge for 5 minutes at 150 g.
6. Wash the pellet twice (repeat the 5th step).
7. Add 10 µl of **Intra-acrosomal protein FITC** antibody to the pellet.
8. Mix well and incubate for 20 minutes at room temperature.
9. Add 0.5 ml of PBS, mix well and analyze using a flow cytometer.

12. Flow cytometry

Analyze stained samples using flow cytometer equipped with a 488 nm excitation laser and appropriate filter set-up.

Fluorescent Count Standard is detected in FITC fluorescence detector as well as monoclonal antibody against intra-acrosomal protein. Fluorescence of propidium iodide and PE-Cy™5 label is detected in PC5 or PerCP fluorescence detector.

13. Data analysis

Sperm and leukocyte count

Visualize measured data as a dot-plot, where FITC fluorescence intensity is on the X-axis and forward-scatter (FSC) is on the Y-axis (Fig.1). Set gates as shown in figure 1: gate **A** for all cells, gate **B** for sperms and gate **C** for Fluorescent Count Standard (fluorescent beads). Then visualize events from the gate **A** as a dot-plot (Fig. 2), where the X-axis represents fluorescence intensity of PE-Cy™5 dye and the Y-axis represents side-scatter (SSC). On the contrary to the sperms, leukocytes are CD45 positive. Separate the bright population of leukocytes using gate **D** as shown in figure 2. Calculate sperm and leukocyte count using following formulas:

$$S = \frac{\text{gateB}}{\text{gateC}} \times \text{dilution} \quad [10^6 \text{ sperm/ml}]$$

$$L = \frac{\text{gateD}}{\text{gateC}} \times \text{dilution} \quad [10^6 \text{ leukocytes/ml}]$$

S represents sperm count in ejaculate
L represents leukocyte count in ejaculate
Gate B represents event count in gate B
Gate C represents event count in gate C
Gate D represents event count in gate D

Sperm viability

Visualize measured data as a forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC) dot-plot. Set the gate around sperm cells as shown in figure 3. Then visualize sperm cells in a histogram (Fig. 4), where the X-axis represents fluorescence intensity of propidium iodide in PE-Cy5 or PerCP channel. Separate positive and negative sperm cells using appropriate gate. Negative population represents viable sperms, while PI-positive population represents non-viable sperms. Viability of sperms is represented by the percentage of viable sperms from all sperm cells.

Acrosome integrity and presence of intra-acrosomal protein

Visualize permeabilized and non-permeabilized samples stained using antibody against intra-acrosomal protein as a forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC) dot-plot and set the gate around sperm events as shown in figure 3. Then visualize sperm events in a histogram (see Fig. 5-7), where the X-axis represents fluorescence intensity in FITC fluorescence detector. Separate positive and negative sperms using appropriate gates.

Figure 5 shows non-permeabilized non-pathological sperms events with low content (< 30 %) of positive sperms. Negative ones represent sperms with intact acrosome and positive ones represent sperms with damaged acrosome.

Figure 6 shows permeabilized non-pathological sperms with dominant content of positive sperm events. Positive sperm events indicate the presence of the intra-acrosomal protein.

Figure 7 shows non-permeabilized pathological sperms with high content (> 30 %) of positive sperm events with damaged acrosome.

14. Expected values

Normal values according to WHO [1]

Sperm count in semen > 15×10⁶/ml
Leukocyte count in semen < 1×10⁶/ml
Sperm viability > 58 %

Normal acrosomal values

Acrosome integrity of sperms < 30 % pathological
Presence of intra-acrosomal protein > 90 % sperms

15. Limitations

- Composition of components was optimized to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.
- Flow cytometer may produce false results if the device has not been aligned and maintained appropriately.
- In case of low sperm counts (less than 10 x 10⁶ /ml) we recommend to check sperm count using microscope. In such samples the results might be affected due to relatively higher content of cell debris in the gated region.
- The monoclonal antibody against Intra-acrosomal protein cannot be used for specific identification of human sperms due to the antibody binding to cell debris or potential cross reactivity with other isoforms of target antigen (sperm-specific glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) present in other cell types.

16. Trademarks

Cy™ and CyDye™ are registered trademarks of GE Healthcare.

1. Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
www.exbio.cz

2. Použití soupravy

SpermFlowEx® Kit umožňuje vyšetřit v ejakulátu následující parametry metodou průtokové cytometrie:

- počet spermií
- počet leukocytů
- vitalita spermií
- integrita akrozomu spermií
- přítomnost intra-akrozomálního proteinu ve spermiích

Vyšetření spermií je vhodné ještě doplnit o měření pohybu a analýzu morfologie pomocí světelného mikroskopu podle doporučení WHO [1].

3. Úvod

V současné době je uváděno, že až 20 % párů trpí poruchami plodnosti. Z toho asi u 1/3 je příčina na straně muže. Neinvazivní vyšetření ejakulátu by proto mělo patřit mezi základní metody sloužící k vyloučení nebo potvrzení andrologické příčiny neplodnosti.

Vyšetření ejakulátu je nejčastěji prováděno pomocí světelného mikroskopu a řídí se kritérii WHO z roku 2010 [1]. Takto provedené vyšetření je subjektivní a závisí na osobní zkušenosti. Při využití průtokové cytometrie se vyšetření objektivizuje, jelikož dochází k měření velkého počtu spermií a také k detekci buněk na základě specifického značení [2]. Významnými parametry, které ovlivňují schopnost oplodnění, jsou počet spermií, jejich životnost, integrita akrozomu a přítomnost intra-akrozomálního vazebného proteinu (IAP) [3]. Akrozom obsahuje enzymy hyaluronidasu a acrosin, které natráví vnější membránu vajíčka zvanou zona pellucida, čímž umožní průnik haploidního jádra spermie do vajíčka. Přítomnost leukocytů v ejakulátu může upozornit na eventuálně probíhající zánět či infekci pohlavního ústrojí.

4. Princip

Počet spermií a počet leukocytů

Měření počtu spermií a leukocytů je založeno na přidání vnitřního standardu (fluorescenčních kuliček o známém počtu) ke vzorku ejakulátu. Detekce leukocytů ve vzorku je prováděna pomocí protilátky anti-CD45 PE-Cy™5.

Vitalita spermií

Vitalita spermií je měřena pomocí propidium jodidu, který proniká narušenou membránou mrtvých buněk a váže se na DNA.

Integrita akrozomu

Měření integrity akrozomu je založeno na detekci intra-akrozomálního proteinu (IAP), který je přítomen v akrozomu. Pokud akrozom spermie není narušen, není tento protein možno detekovat. U spermií s narušenou membránou je tento protein dostupný pro protilátku proti IAP a je detekován.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu

Po narušení či permeabilizaci membrány spermií se intra-akrozomální protein (IAP) stává dostupným pro protilátku proti IAP a je detekován. V případě, že spermie intra-akrozomální protein (IAP) neobsahují, není po permeabilizaci spermií protilátkou proti IAP detekován.

5. Upozornění

- Výrobek je určen pouze pro výzkumné účely.
- Průtokový cytometr pravidelně kalibrujte pomocí fluorescenčních kuliček, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.
- Nepoužívejte reagenty po uplynutí doby použitelnosti.
- Reagenty nevystavujte dlouhodobému působení světla.
- Chraňte obsah vialek před kontaminací.
- Nedodržení doporučeného postupu analýzy může ovlivnit výsledky testů.
- Vzorky sperma jsou považovány za potenciálně infekční materiál, a proto s nimi musí být náležitě nakládáno.

Varování: reagenty Permeabilizing Solution (ED7079-5) obsahuje etanol.

Varování



H-věty

H226: Hořlavá kapalina a páry.

P-věty

P210: Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným plamenem a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.

P260: Nevdechujte páry/aerosoly.

P280: Používejte ochranné rukavice/ochranné brýle/obličejový štít.

P301+P312: PŘI POŽITÍ: Necitíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302+P352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdlem.

P305+P351+P338: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

P501: Odstraňte obsah/obal v autorizovaném místě sběru nebezpečných odpadů.

6. Obsah soupravy

- **ED7079-1 Intra-acrosomal protein FITC** – 1 vialka obsahující 0,5 ml myší monoklonální protilátky proti intra-akrozomálnímu proteinu, značená FITC.
- **ED7079-2 CD45 PE-Cy™5** – 1 vialka obsahující 0,25 ml myší monoklonální protilátky proti CD45, značená PE-Cy™5.
- **ED7079-3 Fluorescent Count Standard** – 1 vialka obsahující 2 ml fluorescenčních kuliček, 1×10⁶ částic/ml.
- **ED7079-4 Propidium Iodide** – 1 vialka obsahující 0,25 ml roztoku propidium jodidu.
- **ED7079-5 Permeabilizing Solution** – 1 lahvička obsahující 25 ml roztoku.

7. Skladování soupravy

SpermFlowEx® Kit skladujte při teplotě 2-8 °C. Doba použitelnosti je vyznačena na jednotlivých reagentech i na krabici soupravy.

8. Změny kvality produktu

V případě pozorování jakéhokoliv zhoršení vlastností produktu, prosíme, neprodleně informujte výrobce prostřednictvím e-mailové adresy: technical@exbio.cz

9. Potřebné vybavení a materiál, který není dodáván

- Vhodné 5ml zkumavky pro barvení buněk (např. 12 × 75 mm)
- PBS pufr
- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Světelný mikroskop
- Centrifuga s rotorem pro zkumavky
- Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm a vhodné emisní filtry.

10. Testovaný vzorek

Vzorky spermatu zpracujte do 8 hodin po odběru. Před měřením skladujte vzorky při laboratorní teplotě.

11. Postup testu

Vzorek ejakulátu orientačně prohlédněte v mikroskopu a podle počtu spermií (malý počet nebo velký počet) naředte buď 1:1 nebo 1:9 do PBS.

Počet spermií a počet leukocytů

1. Do zkumavky napipetujte 50 µl naředěných spermií.
2. Přidejte 10 µl **CD45 PE-Cy™5** reagentie.
3. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
4. Ke vzorku přidejte 50 µl **Fluorescent Count Standard** (nejprve odkapejte potřebné množství dobře promíchaného standardu z kapátka a pak pipetujte přesné množství ke vzorku spermií).
5. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem.

Vitalita spermií

1. Do zkumavky napipetujte 50 µl naředěných spermií.
2. Přidejte 10 µl roztoku **Propidium iodide**.
3. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
4. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem.

Integrita akrozomu

1. Do zkumavky napipetujte 50 µl naředěných spermií.
2. Přidejte 1 ml PBS.
3. Směs promíchejte a centrifugujte 5 minut při 150 g.
4. Sediment 2x promyjte (opakujte 2. a 3. bod postupu).
5. K sedimentu přidejte 10 µl protilátky **Intra-acrosomal protein FITC**.
6. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
7. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu

1. Do zkumavky napipetujte 50 µl naředěných spermií.
2. Přidejte 1 ml **Permeabilizing Solution**, který byl **předem vytemperován na laboratorní teplotu** (20-25 °C).
3. Směs promíchejte a inkubujte 15 minut za laboratorní teploty.
4. Směs centrifugujte 5 minut při 150 g.
5. K sedimentu přidejte 1 ml PBS a centrifugujte 5 minut při 150 g.
6. Sediment 2x promyjte (2x opakujte 5. bod postupu).
7. K sedimentu přidejte 10 µl protilátky **Intra-acrosomal protein FITC**.
8. Směs promíchejte a inkubujte 20 minut za laboratorní teploty.
9. Přidejte 0,5 ml PBS, vzorek promíchejte a změřte průtokovým cytometrem.

12. Cytometrické měření

Analyzujte obarvené vzorky pomocí průtokového cytometru vybaveného excitačním laserem 488 nm a vhodnými filtry.

Fluorescence vnitřního standardu (Fluorescent Count Standard) stejně jako značené protilátky proti intra-akrozomálnímu proteinu je detekována v kanále pro FITC. Fluorescence propidium jodidu (FL1) a fluorescenční značky PE-Cy™5 je detekována v kanále pro PC5 nebo PerCP.

13. Analýza dat

Počet spermií a počet leukocytů

Naměřená data zobrazte v dot-plotu, kde na ose X je intenzita fluorescence ve FITC kanálu a na ose Y forward-scatter (FSC) (Obr. 1). V grafu nastavte regiony (gate) jak je uvedeno na obrázku 1. Gate **A** ohraničuje populaci všech buněk, gate **B** ohraničuje spermie a gate **C** vnitřní standard (Fluorescent Count Standard). Leukocyty v ejakulátu zobrazte vynesemím buněk z gate **A** do dot-plotu (Obr. 2), kde na ose X je intenzita fluorescence PE-Cy™5 a na ose Y je side-scatter (SSC). Populaci leukocytů, která je označena protilátkou CD45 PE-Cy™5, ohraničte pomocí gate **D**. Výpočet počtu spermií a leukocytů ve spermatu proveďte podle následujících vzorců:

$$S = \frac{gateB}{gateC} \times ředění \quad [10^6 \text{ spermií/ml}]$$

$$L = \frac{gateD}{gateC} \times ředění \quad [10^6 \text{ leukocytů/ml}]$$

<i>S</i>	představuje počet spermií v ejakulátu
<i>L</i>	představuje počet leukocytů v ejakulátu
<i>gateB</i>	představuje počet událostí v gate B
<i>gateC</i>	představuje počet událostí v gate C
<i>gateD</i>	představuje počet událostí v gate D

Vitalita spermií

Naměřená data zobrazte v grafické podobě jako forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC). V grafu nastavte gate **E** ohraničující spermie jak je uvedeno na obrázku 3. Události z gate **E** poté zobrazte v histogramu (Obr. 4), kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence propidium jodidu (PE-Cy5 nebo PerCP kanál). Pomocí vhodné umístění gate oddělte v histogramu pozitivní a negativní populace spermií. Negativní populace jsou živé spermie, zatímco pozitivní populace jsou

mrtvé spermie. Vitalitu spermií spočítejte jako procento živých spermií z celkového počtu všech spermií.

Integrita akrozomu a přítomnost intra-akrozomálního proteinu

Naměřená data permeabilizovaného a nepermeabilizovaného vzorku obarveného protilátkou proti intra-akrozomálnímu proteinu zobrazte v grafické podobě jako forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC). V grafu nastavte gate **E** ohraničující spermie jak je uvedeno na obrázku 3. Události z gate **E** poté zobrazte v histogramu (Obr. 5-7), kde na ose X je vynesena intenzita fluorescence FITC. Pomocí vhodně umístěného gate oddělte v histogramu pozitivní a negativní populace spermií.

Nepermeabilizované normální spermie (Obr. 5) vykazují nízké zastoupení (< 30 %) spermií s poškozeným akrozomem, které jsou pozitivní po obarvení protilátkou proti intra-akrozomálnímu proteinu.

Permeabilizované normální spermie (Obr. 6) jsou pozitivní po obarvení protilátkou proti intra-akrozomálnímu proteinu, což je důkaz přítomnosti intra-akrozomálního proteinu ve spermiích.

Nepermeabilizované patologické spermie (Obr. 7) vykazují vysoké zastoupení spermií s poškozeným akrozomem (> 30 %), které jsou pozitivní po obarvení protilátkou proti intra-akrozomálnímu proteinu.

14. Očekávané hodnoty

Normální hodnoty dle WHO [1]

Počet spermií v ejakulátu	> 15×10^6 /ml
Počet leukocytů v ejakulátu	< 1×10^6 /ml
Vitalita spermií	> 58 %

Normální hodnoty akrozomu

Integrita akrozomu spermií	< 30 % poškozených
Přítomnost intra-akrozomálního proteinu	> 90 % spermií

15. Omezení metody

- Složení komponent soupravy bylo optimalizováno s cílem dosáhnout nejlepšího poměru specifického signálu k nespecifickému signálu. Z tohoto důvodu je důležité dodržovat doporučený poměr objemu reagentie a objemu vzorku v každém testu.
- Průtokový cytometr může poskytovat špatné hodnoty, pokud není dobře seřizen a udržován.
- U vzorků s počtem spermií nižším než 10×10^6 /ml doporučujeme provést kontrolní přepočítání spermií na mikroskopu z důvodů možného zkreslení výsledku v důsledku vyššího relativního zastoupení buněčné drtě v regionu ohraničujícím spermie.
- Monoklonální protilátku proti intra-akrozomálním proteinu nelze použít pro specifickou detekci lidských spermií kvůli její vazbě na buněčnou drť (debris) i kvůli potenciální reaktivitě s jinými izoformami cílového antigenu (sperm-specific glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), které jsou přítomné i v jiných typech buněk.

16. Trademarks

Cy™ a CyDye™ jsou registrovanými značkami společnosti GE Healthcare.

2. Výrobca

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
252 42 Vestec, Czech Republic
Tel: +420 261 090 666
Fax: +420 261 090 660
E-mail: orders@exbio.cz
www.exbio.cz

2. Použitie súpravy

SpermFlowEx® Kit umožňuje vyšetriť v ejakuláte nasledujúce parametre metódou prietokovej cytometrie:

- počet spermii
- počet leukocytov
- vitalitu spermii
- integritu akrozómu spermii
- prítomnosť intra-akrozomálneho proteínu v spermiiach

Vyšetrenie spermii je vhodné ešte doplniť o meranie pohyblivosti a analýzu morfológie pomocou svetelného mikroskopu podľa doporučení WHO [1].

3. Úvod

V súčasnej dobe sa uvádza, že až 20 % párov trpí poruchami plodnosti. Z toho asi u 1/3 je príčina na strane muža. Neinvasívne vyšetrenie ejakulátu by preto malo patriť medzi základné metódy slúžiace na vylúčenie alebo potvrdenie andrologickej príčiny neplodnosti.

Vyšetrenie ejakulátu sa najčastejšie realizuje pomocou svetelného mikroskopu a riadi sa kritériami WHO z roku 2010 [1]. Takéto vyšetrenie je subjektívne a závisí od osobnej skúsenosti. Pri využití prietokovej cytometrie sa vyšetrenie objektívizuje, keďže počet nameraných spermii je dostatočne veľký a detekcia buniek je uskutočnená na základe špecifického značenia [2]. Významnými parametrami, ktoré ovplyvňujú schopnosť oplodnenia, sú počet spermii, ich životnosť, integrita akrozómu a prítomnosť intra-akrozomálneho väzbového proteínu (IAP) [3]. Akrozóm obsahuje enzýmy hyaluronidázu a akrozín, ktoré rozložia vonkajšiu membránu vajíčka nazývanú *zona pellucida*, čím umožnia prieniku haploidného jadra spermie do vajíčka. Prítomnosť leukocytov v ejakuláte môže upozorniť na eventuálny prebiehajúci zápal či infekciu pohlavného ústrojenstva.

4. Princíp

Počet spermii a počet leukocytov

Meranie počtu spermii a leukocytov je založené na pridaní vnútorného štandardu (fluorescenčných guľčiek so známou koncentráciou) k vzorke ejakulátu. Detekcia leukocytov vo vzorke je uskutočnená pomocou protilátky anti-CD45 PE-Cy™5.

Vitalita spermii

Vitalita spermii je meraná pomocou propidium jodidu, ktorý preniká narušenou membránou mŕtvych buniek a viaže sa na DNA.

Integrita akrozómu

Meranie integrity akrozómu je založené na detekcii intra-akrozomálneho proteínu (IAP), ktorý je prítomný v akrozóme. Kým nie je akrozóm spermie narušený, nie je možné detekovať

prítomnosť tohto proteínu. U spermii s narušenou membránou je tento proteín dostupný pre protilátku proti IAP a je detekovaný.

Prítomnosť intra-akrozomálneho proteínu

Po narušení či permeabilizácii membrány spermii sa intra-akrozomálny proteín (IAP) stáva dostupným pre protilátku proti IAP a je detekovaný. V prípade, že spermie intra-akrozomálny proteín (IAP) neobsahujú, nie je po permeabilizácii spermii protilátkou proti IAP detekovaný.

5. Upozornenie

- Výrobok je určený len pre výskumné účely.
- Prietokový cytometer pravidelne kalibrujte pomocou fluorescenčných guľčiek, aby bola zaistená stabilná citlivosť detektorov.
- Nepoužívajte reagenty po uplynutí doby použiteľnosti.
- Nevystavujte reagenty dlhodobému pôsobeniu svetla.
- Chráňte obsah vialiek pred kontamináciou.
- Nedodržanie odporúčaného postupu analýzy môže ovplyvniť výsledky testov.
- Vzorky ejakulátu sú považované za potenciálne infekčný materiál, a preto sa s nimi musí náležite zaobchádzať.

Varovanie: reagentia Permeabilizing Solution (ED7079-5) obsahuje etanol.

Varovanie



H-vety

H226: Horľavá kvapalina a pary.

P-vety

- P210: Uchovávajte mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite.
- P260: Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly.
- P280: Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
- P301+P312: PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch volajte Národné toxikologické informačné centrum alebo lekára.
- P302+P352: PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla.
- P305+P351+P338: PRI ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
- P501: Zneškodnite obsah/nádoby v autorizovanom mieste zberu nebezpečných odpadov.

6. Obsah súpravy

- **ED7079-1 Intra-acrosomal protein FITC** – 1 fľaštička obsahujúca 0,5 ml myšacej monoklonovej protilátky proti intra-akrozomálnemu proteínu, označenej FITC.
- **ED7079-2 CD45 PE-Cy™5** – fľaštička obsahujúca 0,25 ml myšacej monoklonovej protilátky proti CD45, označenej PE-Cy™5.
- **ED7079-3 Fluorescent Count Standard** – 1 fľaštička obsahujúca 2 ml fluorescenčných guľčiek, 1×10^6 častíc/ml.
- **ED7079-4 Propidium Iodide** – 1 fľaštička obsahujúca 0,25 ml roztoku propidium jodidu.
- **ED7079-5 Permeabilizing Solution** – 1 fľaštička obsahujúca 25 ml roztoku.

7. Skladovanie súpravy

SpermFlowEx® Kit skladujte pri teplote 2-8 °C. Doba použiteľnosti je vyznačená na jednotlivých reagentoch a na krabici súpravy.

8. Zmeny kvality produktu

V prípade pozorovania akéhokoľvek zhoršenia vlastností produktu, prosím, okamžite informujte výrobcu prostredníctvom e-mailovej adresy: technical@exbio.cz

9. Potrebné vybavenie a materiál, ktorý sa nedodáva

- Vhodné 5ml skúmavky na značenie buniek (napr. 12 × 75 mm)
- Pufer PBS
- Sada automatických pipiet s jednorazovými špičkami
- Vortex
- Svetelný mikroskop
- Centrifúga s rotorom pre skúmavky
- Prietokový cytometer - excitácia modrým laserom 488 nm a vhodné emisné filtre.

10. Testovaná vzorka

Vzorky ejakulátu spracujte do 8 hodín od odberu. Pred meraním skladujte vzorky pri laboratórnej teplote.

11. Postup testu

Vzorku ejakulátu orientačne skontrolujte pod svetelným mikroskopom a podľa počtu spermii (veľký počet alebo malý počet) nariedte buď 1:9 alebo 1:1 do PBS..

Počet spermii a počet leukocytov

1. Do skúmavky napipetujte 50 µl nariadených spermii.
2. Pridajte 10 µl **CD45 PE-Cy™5** reagentie.
3. Zmes premiešajte a inkubujte 20 minút pri laboratórnej teplote.
4. K vzorke pridajte 50 µl **Fluorescent Count Standard** (najskôr si odkvapkajte potrebné množstvo dobre premiešaného štandardu z kvapkadla do mikroskúmavky a potom pipetujte presné množstvo k vzorke spermii).
5. Pridajte 0,5 ml PBS, vzorku premiešajte a analyzujte prietokovým cytometrom.

Vitalita spermii

1. Do skúmavky napipetujte 50 µl nariadených spermii.
2. Pridajte 10 µl roztoku **Propidium Iodide**.
3. Zmes premiešajte a inkubujte 20 minút pri laboratórnej teplote.
4. Pridajte 0,5 ml PBS, vzorku premiešajte a analyzujte prietokovým cytometrom.

Integrita akrozómu

1. Do skúmavky napipetujte 50 µl nariadených spermii.
2. Pridajte 1 ml PBS.
3. Zmes premiešajte a centrifugujte 5 minút pri 150 g.
4. Sediment 2x premyte (opakujte 2. a 3. bod postupu).
5. K sedimentu pridajte 10 µl protilátky **Intra-acrosomal protein FITC**.
6. Zmes premiešajte a inkubujte 20 minút pri laboratórnej teplote.
7. Pridajte 0,5 ml PBS, vzorku premiešajte a analyzujte prietokovým cytometrom.

Prítomnosť intra-akrozomálneho proteínu

1. Do skúmavky napipetujte 50 µl nariadených spermii.
2. Pridajte 1 ml **Permeabilizing Solution**, ktoré bolo **predtým vytemperované na laboratórnu teplotu** (20-25 °C).
3. Zmes premiešajte a inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote.
4. Zmes centrifugujte 5 minút pri 150 g.
5. K sedimentu pridajte 1 ml PBS a centrifugujte 5 minút pri 150 g.
6. Sediment 2x premyte (2x opakujte 5. bod postupu).
7. K sedimentu pridajte 10 µl protilátky **Intra-acrosomal protein FITC**.
8. Zmes premiešajte a inkubujte 20 minút pri laboratórnej teplote.
9. Pridajte 0,5 ml PBS, vzorky premiešajte a analyzujte prietokovým cytometrom.

12. Analýza prietokovým cytometrom

Označené vzorky analyzujte prietokovým cytometrom vybaveným excitačným laserom 488 nm a vhodnými filtermi.

Fluorescencia vnútorného štandardu (Fluorescent Count Standard), rovnako ako značenej protilátky proti intra-akrozomálnemu proteínu je detekovaná detektorom pre FITC. Fluorescencia propidium jodidu (FL1) a fluorescenčnej značky PE-Cy™5 je detekovaná detektorom pre PC5 alebo PerCP.

13. Vyhodnotenie testu

Počet spermii a počet leukocytov

Namerané dáta zobrazte v grafickej podobe tak, aby na osi X bola intenzita fluorescencie FITC a na osi Y *forward-scatter* (FSC) (Obr. 1). V grafe nastavte regióny (gate) ako sa uvádza na obrázku 1. Región **A** ohraničuje populáciu všetkých buniek, región **B** ohraničuje spermie a región **C** vnútorný štandard (fluorescenčné guľičky). Leukocyty v ejakuláte zobrazíte vynesím buniek z regiónu **A** do dot-plotu (Obr. 2), kde na osi X je intenzita fluorescencie PE-Cy™5 a na osi Y *side-scatter* (SSC). Populáciu leukocytov, ktorá je označená protilátkou CD45 PE-Cy™5, ohraničte pomocou regiónu **D**. Počet spermii a leukocytov v ejakuláte vypočítajte podľa nasledujúcich vzorcov:

$$S = \frac{\text{regiónB}}{\text{regiónC}} \times \text{riedenie} [10^6 \text{ spermii/ml}]$$

$$L = \frac{\text{regiónD}}{\text{regiónC}} \times \text{riedenie} [10^6 \text{ leukocytov/ml}]$$

<i>S</i>	predstavuje počet spermii v ejakuláte
<i>L</i>	predstavuje počet leukocytov v ejakuláte
<i>región B</i>	predstavuje počet udalostí v gate B
<i>región C</i>	predstavuje počet udalostí v gate C
<i>región D</i>	predstavuje počet udalostí v gate D

Vitalita spermii

Namerané dáta zobrazte v grafickej podobe ako *forward-scatter* (FSC) proti *side-scatter* (SSC). V grafe nastavte región **E** ohraničujúci spermie ako sa uvádza na obrázku 3. Udalosti z regiónu **E** potom zobrazte ako histogram (Obr. 4), kde na osi X je vynesená intenzita fluorescencie propidium jodidu (PI). Pomocou vhodne umiestneného regiónu oddeľte v histograme pozitívne od negatívnych populácií spermii. Negatívne populácie sú živé spermie, PI-pozitívne populácie sú mŕtve

spermie. Vitalitu spermií spočítajte ako percento živých spermií z celkového počtu všetkých spermií.

Integrita akrozómu a prítomnosť intra-akrozomálneho proteínu

Namerané dáta permeabilizovaného a nepermeabilizovaného vzorku označeného protilátkou proti intra-akrozomálnemu proteínu zobrazte v grafickej podobe *forward-scatter* (FSC) proti *side-scatter* (SSC). V grafe nastavte región E ohraničujúci spermie ako sa uvádza na obrázku 3. Udalosti z regiónu E potom zobrazte ako histogram (Obr. 5-7), kde na osi X je vynesená intenzita fluorescencie FITC. Pomocou vhodne umiestneného regiónu oddelíte v histograme pozitívne od negatívnych populácií spermií.

Nepermeabilizované normálne spermie (Obr. 5) vykazujú nízke zastúpenie (< 30 %) spermií s poškodeným akrozómom, ktoré sú pozitívne po ofarbení protilátkou proti intra-akrozomálnemu proteínu.

Permeabilizované normálne spermie (Obr. 6) vykazujú pozitívitu po ofarbení protilátkou proti intra-akrozomálnemu proteínu, čo je dôkaz prítomnosti intra-akrozomálneho proteínu v spermiách.

Nepermeabilizované patologické spermie (Obr. 7) vykazujú vysoké zastúpenie spermií s poškodeným akrozómom (> 30 %), ktoré sú pozitívne po ofarbení protilátkou proti intra-akrozomálnemu proteínu.

14. Očakávané hodnoty

Normálne hodnoty podľa WHO [1]

Počet spermií v ejakuláte	> 15×10 ⁶ /ml
Počet leukocytov v ejakuláte	< 1×10 ⁶ /ml
Vitalita spermií	> 58 %

Normálne hodnoty akrozómu

Integrita akrozómu spermií	< 30 % poškodených
Prítomnosť intra-akrozomálneho proteínu	> 90 % spermií

15. Obmedzenia metódy

- Zloženie komponent súpravy bolo optimalizované s cieľom dosiahnuť čo najlepší pomer špecifického signálu k nešpecifickému signálu. Z tohto dôvodu je dôležité dodržiavať odporúčaný pomer objemu reagencie a objemu vzorky v každom teste.
- Prietokový cytometer môže poskytovať nepresné hodnoty, ak nie je pravidelne kalibrovaný a udržiavaný.
- U vzoriek s počtom spermií nižším než 10 x 10⁶ /ml odporúčame kontrolné prepočítanie spermií pomocou mikroskopu z dôvodu možného skreslenia výsledku spôsobeného vyšším relatívnym zastúpením zvyškov buniek v regióne ohraničujúcom spermie.
- Monoklonálnu protilátku proti intra-akrozomálnemu proteínu nie je možné použiť pre špecifickú detekciu ľudských spermií kvôli jej schopnosti viazať sa na bunkovú drť (debris) a kvôli potenciálnej reaktivite voči iným izoformám cieľového antigénu (sperm-specific glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), ktoré nie sú prítomné len v spermiách, ale aj v iných bunkách.

16. Trademarks

Cy™ a CyDye™ sú registrované značky spoločnosti GE Healthcare.

17. Example of data analysis / Vzorové vyhodnocení / Vzorové vyhodnotenie

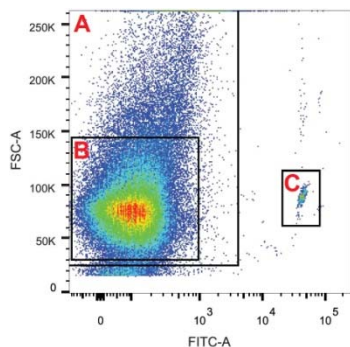


Fig. 1 Measurement of sperm count in semen
Obr. 1 Měření počtu spermií v ejakulátu
Obr. 1 Meranie počtu spermií v ejakuláte

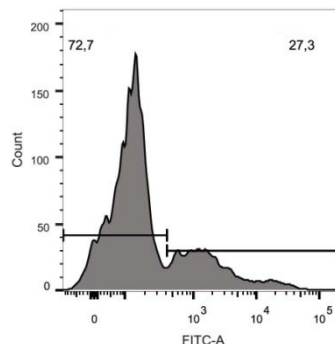


Fig. 5 Non-permeabilized, non-pathological sperm
Obr. 5 Nepermeabilizované normální spermie
Obr. 5 Nepermeabilizované normálne spermie

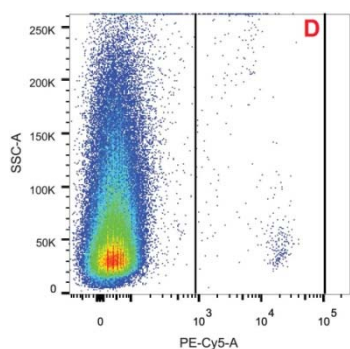


Fig. 2 Measurement of leukocyte count in semen
Obr. 2 Měření počtu leukocytů v ejakulátu
Obr. 2 Meranie počtu leukocytov v ejakuláte

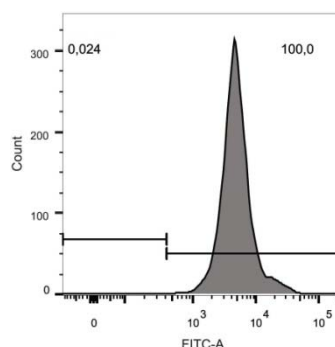


Fig. 6 Permeabilized, non-pathological sperm
Obr. 6 Permeabilizované normální spermie
Obr. 6 Permeabilizované normálne spermie

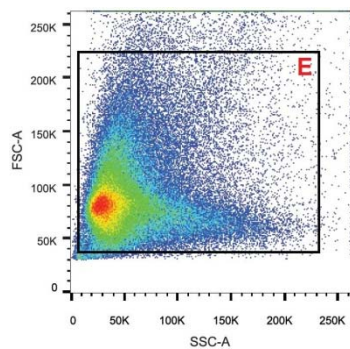


Fig. 3 Sperm gating
Obr. 3 Ohraničení spermií
Obr. 3 Ohraničenie spermií

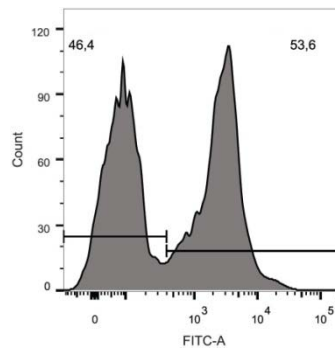


Fig. 7 Non-permeabilized pathological sperm
Obr. 7 Nepermeabilizované patologické spermie
Obr. 7 Nepermeabilizované patologické spermie

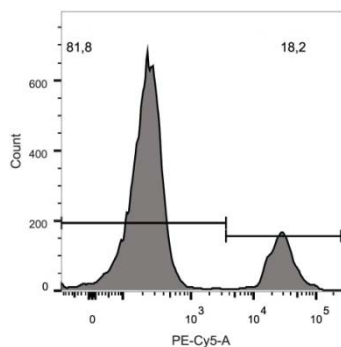


Fig. 4 Measurement of sperm viability
Obr. 4 Měření vitality spermií
Obr. 4 Meranie vitality spermií

18. References / Literatura / Literatúra







[1] WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. World Health Organization, 5th edition, 2010

[2] Gilan L, Evans G, Maxwell WM (2005) Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology. 63: 445-57

[3] Peknicova J, Chladek D, Hozak P (2005) Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. Am J Reprod Immunol. 53(1): 42-9

[4] Leukocyte Typing IV., Knapp W. et al. (Eds.), Oxford University Press (1989).

19. Explanation of symbols / Vysvětlení symbolů / Vysvetlenie symbolov

	Catalog number Katalogové číslo Katalógové číslo
	Manufacturer identification Výrobce Výrobca
	Consult the manual before use Viz návod k použití Vid' návod na použitie
	Store within temperature limits Rozmezí skladovacích teplôt Rozmedzie skladovacích teplôt
	Batch code Číslo šarže
	Use by Použitelné do Použitelné do