

exbio

SpermFlowEx Kit 25 testů | Kat. č. ED7079

RUO

Nepoužívat pro diagnostické a terapeutické procedury.

Technický list (CS)
Verze: ED7079_TDS_v7_CS
Datum vydání: 21-12-2024

Symboły použité k označení produktu

RUO	Pouze pro výzkumné účely		Chránit před vlhkem
	Výrobce	CONTENTS	Obsah
	Čtěte návod k použití		
	Obsah postačuje pro <n> testů		
REF	Katalogové číslo		
LOT	Kód dávky		
	Použití do data		
	Omezení teploty		
	Chránit před slunečním zářením		

Popis

Výrobek je určen pouze pro výzkumné účely. Diagnostické nebo terapeutické použití je přísně zakázáno.

SpermFlowEx Kit je určen k analýze lidského ejakulátu pomocí průtokové cytometrie za účelem stanovení:

- počtu spermií
- počtu leukocytů
- vitality spermií
- integrity akrozomu spermií
- přítomnosti intra-akrozomálního proteinu ve spermiích

Počet spermií a počet leukocytů

Měření počtu spermií a počtu leukocytů zahrnuje přidání vnitřního standardu (fluorescenčních kuliček o známé koncentraci) ke vzorku ejakulátu. Leukocyty jsou detekovány pomocí fluorescenčně značené protilátky proti lidskému antigenu CD45 (CD45 PE-Cy5).

Vitalita spermií

Životaschopnost spermií je určována pomocí barviva propidium jodidu, který proniká do buněk s poškozenou membránou (mrtvé buňky) a váže se na jejich DNA.

Integrita akrozomu

Integrita akrozomu je hodnocena detekcí intraakrozomálního proteinu (IAP), který se nachází uvnitř akrozomu spermie. Pokud je akrozom neporušený, IAP zůstává nedetekovatelný. Při poškození membrány spermie je však IAP exponován a stává se přístupným pro protilátku proti IAP, což umožňuje detekci tohoto proteinu.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu

Po permeabilizaci membrány spermie je intra-akrozomální protein (IAP) detekován pomocí protilátky specifické pro IAP. Pokud spermie IAP neobsahuje, nebude po permeabilizaci detekován.

Analýzu by mělo doplnit vyšetření pohyblivosti a morfologie spermií pomocí světelného mikroskopu, v souladu s doporučeními WHO^[1].

Neplodnost je rostoucím problémem lidské populace, který postihuje téměř 20 % párů, přičemž jedna třetina případů je způsobena faktory na straně muže. Analýza semene proto hraje klíčovou roli v neinvazivních diagnostických postupech, které mohou pomoci potvrdit nebo vyloučit andrologickou příčinu neplodnosti.

Vyšetření ejakulátu se obvykle provádí světelným mikroskopem dle kritérií WHO z roku 2010^[1]. Toto vyšetření je však subjektivní a závisí na osobních zkušenostech

vyšetřujícího. Naproti tomu průtoková cytometrie nabízí vyváženější a objektivnější analýzu, protože zkoumá větší počet spermií a detekuje je pomocí specifického barvení [2].

Klíčové parametry, které významně ovlivňují schopnost spermie oplodnit vajíčko, zahrnují: počet spermií, vitalitu spermií, integritu akrozomu a přítomnost intra-akrozomálního proteinu (IAP)^[3]. Akrozom obsahuje trávicí enzymy, jako je hyaluronidáza a akrozin, které narušují vnější membránu vajíčka zvanou zona pellucida, což umožňuje průnik haploidního jádra spermie do vajíčka. Přítomnost leukocytů v semeni navíc naznačuje zánět nebo možné pohlavně přenosné onemocnění.

Poskytované materiály

Obsah

Produkt SpermFlowEx Kit vystačí na provedení 25 testů a je dodáván ve formátu:

Intra-acrosomal protein FITC ED7079-1 (1 lahvička) obsahující 0,5 ml fluoresceinem označené myši monoklonální protilátky proti intra-akrozomálnímu proteinu (klon Hs-8).

CD45 PE-Cy5 ED7079-2 (1 lahvička) obsahující 0,25 ml PE-Cy[™]5 označené myši monoklonální protilátky proti CD45 (klon MEM-28).

Fluorescent Count Standard ED7079-3 (1 lahvička) obsahující 2 ml fluorescenčních kuliček, 1×10^6 částic/ml.

Propidium Iodide ED7079-4 (1 lahvička) obsahující 0,25 ml roztoku propidium jodidu.

Permeabilizing Solution ED7079-5 (1 láhev) obsahující 25 ml permeabilizačního činidla.

Nutné, ale neposkytované materiály

Testovací zkušavky s kulatým dnem (12 x 75 mm)

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr (1× PBS), pH 7,2 – 7,4

Nutná zařízení

Automatické pipety s jednorázovými špičkami (10 µl – 1 ml) pro pipetování vzorků a činidel

Vortex mixer

Centrifuga

Světelný mikroskop

Průtokový cytometr s laserovým excitačním zdrojem (488 nm), detektory pro rozptýlené světlo, optickými filtry a emisními detektory vhodnými pro sběr signálů

z fluorochromů uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2 Spektrální charakteristika fluorochromů použitých v produktu

Flurochrom	Excitace [nm]	Emise [nm]
FITC	488	525
PE-Cy™5	488	670
Propidium jodid	535	617

Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C.

Chraňte před přímým slunečním světlem.

Informace o stabilitě po prvním otevření a době použitelnosti po prvním otevření, spolu s podmínkami skladování a stabilitou pracovních roztoků (v případě potřeby) naleznete v části Postup (Příprava reagentů).

Výstrahy, opatření a omezení

GHS klasifikace nebezpečnosti

VÝSTRAHA: Permeabilizing Solution (ED7079-5) obsahuje ethanol (č. 64-17-5) v koncentracích klasifikovaných jako nebezpečné.

Prvky označení	Signální slovo
	Varování
H-věty	H226: Hořlavá kapalina a páry.
P-věty	P210: Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření. P260: Nevdechujte aerosoly. P301+P312: PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P302+P352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. 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. P403+P235: Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte v chladu. P501: Odstraňte obsah/obal podle místních předpisů.

Úplné informace o rizicích, která představují chemické látky a směsi obsažené v tomto výrobku a o tom, jak s nimi zacházet a jak je likvidovat, naleznete v Bezpečnostním listu (SDS), který je k dispozici na www.exbio.cz.

Biologické riziko

Lidské biologické vzorky, krevní vzorky a jakékoliv materiály, které s nimi přicházejí do kontaktu, jsou vždy považovány za infekční.

Používejte osobní ochranné a bezpečnostní pomůcky, abyste zabránili kontaktu s kůží, očima a sliznicemi.

Dodržujte všechny platné zákony, předpisy a postupy pro manipulaci a likvidaci infekčních materiálů.

Projevy znehodnocení prostředku

Normální vzhled reagentie Intra-acrosomal protein FITC je žluto-zeleně zabarvená kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Normální vzhled reagentie CD45 PE-Cy5 je tmavě červeně až fialově zabarvená kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Normální vzhled reagentie Propidium Iodide je růžovo-červeně zabarvená kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Normální vzhled reagentie Fluorescent Count Standard je čirá kapalina. Vzhledem k tomu, že je reagentie dodávána v černých pro světlo nepropustných lahvíčkách, nemůže uživatel vzhled posoudit, ale nepoužívejte činidlo, pokud při otevření máte podezření na jakoukoli změnu vzhledu, například zákal nebo známky precipitace.

Normální vzhled reagentie Permeabilizing Solution je čirá kapalina. Nepoužívejte, pokud pozorujete jakoukoli změnu vzhledu, např. zákal nebo známky precipitace.

Omezení použití

Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítcích výrobku.

Vzorek

Vzorky ejakulátu zpracujte do 8 hodin po odběru. Skladujte vzorky při laboratorní teplotě.

Zkontrolujte počet spermií v ejakulátu pomocí světelného mikroskopu. Naředte ejakulát 1:1 nebo 1:9 s PBS podle odhadovaného počtu počtu spermií (čím větší počet, tím větší ředění).

V případě nízkého počtu spermií (méně než $10 \times 10^6/\text{ml}$) budou výsledky analýzy počtu spermií ovlivněny přítomností buněčného debrisu v regionu ohraničujícím spermatozoa.

Postup

Příprava reagensí

Nechte Permeabilizing Solution vytemperovat na laboratorní teplotu (20-25 °C).

Počet spermíí a počet leukocytů

1. Pipetujte 50 µl zředěného ejakulátu na dno testovací zkumavky.
2. Přidejte 10 µl CD45 PE-Cy5.
Vortexujte a následně inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě.
3. Přidejte 50 µl Fluorescent Count Standard (nejprve standard dobře promíchejte a dejte několik kapek do čisté mikrozkušavky, poté napipetujte přesný objem standardu z mikrozkušavky do zkumavky se vzorkem spermatu).
4. Přidejte 0,5 ml PBS, promíchejte a analyzujte pomocí průtokového cytometru.

Vitalita spermíí

1. Pipetujte 50 µl zředěného ejakulátu na dno testovací zkumavky.
2. Přidejte 10 µl roztoku Propidium Iodid.
3. Vortexujte a následně inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě.
4. Přidejte 0,5 ml PBS, promíchejte a změřte pomocí průtokového cytometru.

Integrita akrozomu

1. Pipetujte 50 µl zředěného ejakulátu na dno testovací zkumavky.
2. Přidejte 1 ml PBS, promíchejte a centrifugujte 5 minut při 150× g. Odstraňte supernatant.
3. Promyjte ještě jednou (opakuje krok 2).
4. K peletě přidejte 10 µl protilátky Intra-acrosomal protein FITC.
5. Vortexujte a následně inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě.
6. Přidejte 0,5 ml PBS, promíchejte a změřte pomocí průtokového cytometru.

Přítomnost intra-akrozomálního proteinu

1. Pipetujte 50 µl zředěného ejakulátu na dno testovací zkumavky.
2. Přidejte 1 ml Permeabilizing Solution vytemperovaného na laboratorní teplotu (20-25 °C).
3. Vortexujte a následně inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě.
4. Centrifugujte 5 minut při 150× g. Odstraňte supernatant.

5. K peletě přidejte 1 ml PBS, promíchejte a centrifugujte 5 minut při 150× g.
6. Promyjte ještě jednou (opakujte krok 5).
7. K peletě přidejte 10 µl protilátky Intra-acrosomal protein FITC.
8. Vortexujte a následně inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě.
9. Přidejte 0,5 ml PBS, promíchejte a změřte pomocí průtokového cytometru.

Analýza průtokovým cytometrem

Průtokový cytometr vybraný k použití s produktem SpermFlowEx Kit musí být rutinně kalibrován pomocí fluorescenčních mikrokuliček podle pokynů výrobce cytometru, aby byla zajištěna stabilní citlivost detektorů.

Při nesprávné údržbě může průtokový cytometr poskytovat falešné výsledky.

V sekci Nutná zařízení jsou uvedeny potřebné specifikace cytometru pro lasery a fluorescenční detektory podle excitačních a emisních charakteristik fluorochromů.

Před analýzou obarveného vzorku nastavte napětí na požadovaných fluorescenčních detektorech. Napětí na fotonásobiči by mělo být nastaveno dostatečně vysoko, aby minimum negativních událostí bylo zaznamenáno v nultém kanálu na ose fluorescence. Napětí na fotonásobiči by také nemělo překročit hodnoty, při kterých jsou pozitivní události natlačeny k pravé ose.

Kompenzujte fluorescenční signály mezi detektory před nebo po sběru dat. Pokud jsou fluorescenční signály nesprávně kompenzovány nebo pokud jsou regiony (gates) umístěny nepřesně, mohou být data nesprávně interpretována.

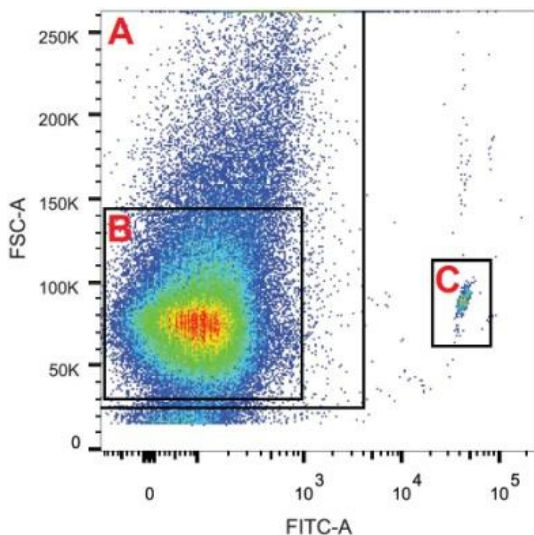
Fluorescence vnitřního standardu (Fluorescent Count Standard) stejně jako značené protilátky proti intra-akrozomálnímu proteinu je detekována v kanále pro FITC. Fluorescence propidium jodidu a fluorescenční značky PE-CyTM5 je detekována v kanále pro PC5 nebo PerCP.

Pro analýzu naměřených dat je možné použít software vyvinutý výrobcem cytometru nebo software určený pro offline analýzu cytometrických dat (např. FlowJoTM, VenturiOne®, InfinicytTM).

Analýza dat - Počet spermií a počet leukocytů

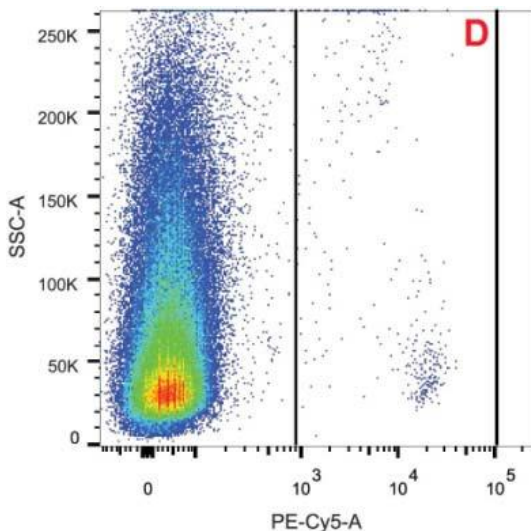
Data zobrazte v grafu dot-plot, kde intenzita fluorescence v detektoru pro FITC je na ose X a forward-scatter (FSC) na ose Y (Obr. 1). V grafu nastavte regiony, jak je ukázáno na obrázku 1: Region **A** ohraničující populaci všech buněk, region **B** ohraničující spermatozoa a region **C** ohraničující Fluorescent Count Standard (fluorescenční kuličky).

Obrázek 1 Měření počtu spermií v ejakulátu.



Poté zobrazte události z Gate A v grafu dot-plot, kde osa X představuje intenzitu fluorescence barvení pomocí CD45 PE-Cy5 a osa Y představuje side-scatter (SSC). Na rozdíl od spermatozoí jsou leukocyty CD45 pozitivní. Oddělte leukocyty výběrem populace s vysokou intenzitou značení CD45-PE Cy5, jak je znázorněno na obrázku 2 (Region D).

Obrázek 2 Měření počtu leukocytů v ejakulátu.



Vypočítejte koncentraci spermií a leukocytů pomocí následujících vzorců:

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

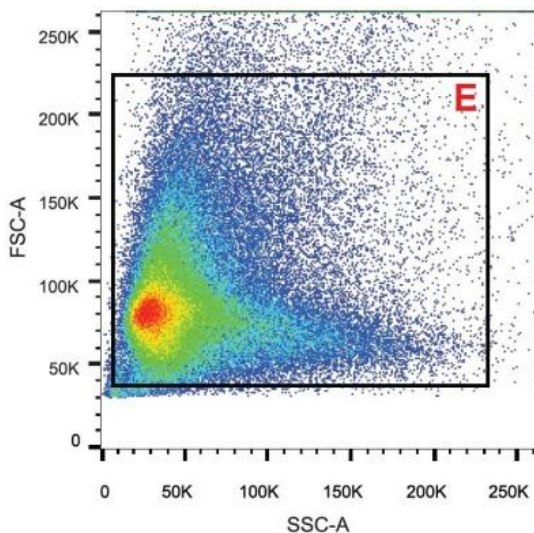
$$L = \frac{gateD}{gateC} \times \text{ředění} \quad [10^6 \text{ leukocytů/ml}]$$

- S představuje počet spermií v ejakulátu
- L představuje počet leukocytů v ejakulátu
- gate B představuje počet událostí v regionu B
- gate C představuje počet událostí v regionu C
- gate D představuje počet událostí v regionu D

Analýza dat – Vitalita spermií

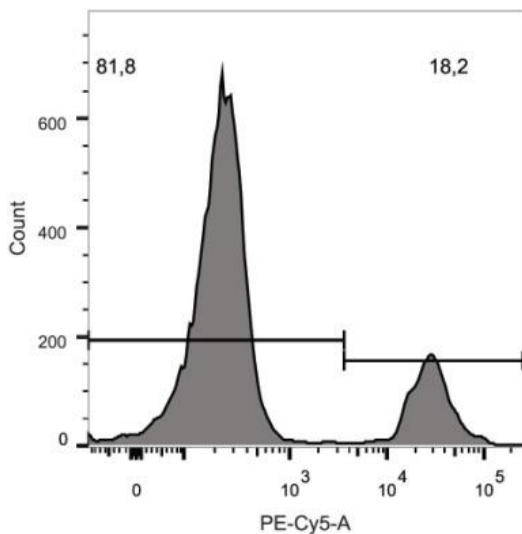
Naměřená data zobrazte jako graf forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC).
Nastavte ohraničující region kolem spermií, jak je znázorněno na obrázku 3.

Obrázek 3 Ohraničení spermií.



Následně zobrazte spermie v histogramu, kde osa X představuje intenzitu fluorescence propidium jodidu (obrázek 4). Oddělte pozitivní a negativní populaci spermií pomocí vhodně umístěného gate. Neobarvená (negativní) populace představuje životaschopné spermie, zatímco pozitivní populace představuje neživotné spermie. Životaschopnost spermií je vyjadřována jako podíl životaschopných spermií vzhledem k celkové populaci spermií.

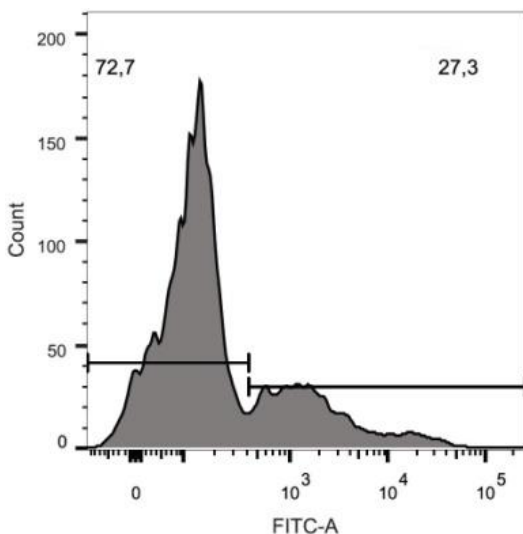
Obrázek 4 Měření životaschopnosti spermií.



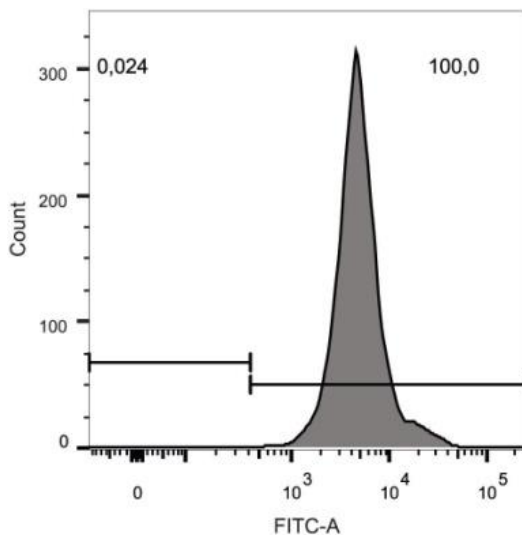
Analýza dat – Integrita akrozomu a přítomnost intra-akrozomálního proteinu

Zobrazte data z permeabilizovaného a nepermeabilizovaného vzorku obarveného protilátkou proti intra-akrozomálnímu proteinu v grafu forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC) a nastavte region E ohraničující spermie (obrázek 3). Poté, zobrazte události z regionu E v histogramu (Obr. 5-7), kde osa X představuje intenzitu fluorescence v detektoru pro FITC. Oddělte pozitivní a negativní spermie pomocí vhodně umístěného rozhraní (příklady na obrázku 5, 6, 7).

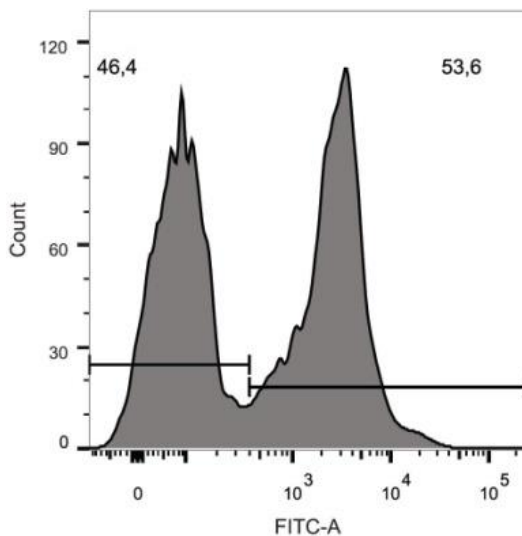
Obrázek 5 Nepermeabilizované, normální spermie s nízkým zastoupením (< 30 %) pozitivních spermií. Negativní události představují spermie s neporušenou akrozomální membránou, zatímco pozitivní události představují spermie s poškozenou akrozomální membránou.



Obrázek 6 Permeabilizované, normální spermie s dominantním zastoupením (100 %) pozitivních spermií. Pozitivní události dokládají přítomnost intra-akrosomálního proteinu.



Obrázek 7 Nepermeabilizované patologické spermie s vysokým zastoupením (> 30 %) pozitivních spermií s poškozenou akrosomální membránou.



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 (=procento pozitivních spermií v nepermeabilizovaném vzorku)	<30%
Přítomnost intra-akrozomálního proteinu (=procento pozitivních spermií v permeabilizovaném vzorku)	> 90%

Odkazy

- 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.

Použití ochranných známek třetích stran

FlowJo™ je registrované ochranné známky firmy Becton, Dickinson a Company, Cy™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytiva, VenturiOne® je registrovaná ochranná známka firmy Applied Cytometry, Infinicyt™ je registrovaná ochranná známka firmy Cytognos S.L..

Historie revizí

Verze 7, ED7079_TDS_v7

Uspořádání TDS bylo změněno, text obsahuje drobné úpravy pro zlepšení srozumitelnosti obsahu textu.

Výrobce

EXBIO Praha, a.s.
Nad Safinou II 341
25250 Vestec
Czech Republic

Kontaktní informace

info@exbio.cz
technical@exbio.cz
orders@exbio.cz
www.exbio.cz

POZNÁMKA: Jakákoli vážná událost, která se vyskytla v souvislosti s produktem, musí být oznámena výrobcí a místnímu příslušnému úřadu.