(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104303059 B
(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201380023706.3
(22)申请日 2013.03.29
(30)优先权数据
20120100185 2012.03.29 GR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GR2013/000016 2013.03.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/144662 EN 2013.10.03
(73)专利权人 瓦西利奥斯·齐列瓦可斯
地址 希腊雅典
专利权人 阿格勒斯·格瑞扎培斯
(72)发明人 瓦西利奥斯·齐列瓦可斯
阿格勒斯·格瑞扎培斯
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 浦彩华 张颖玲
(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)

(56)对比文件
CN 1620611 A,2005.05.25,
WO 03/060520 A2,2003.07.24,
WO 02/04666 A2,2002.01.17,
US 2006/0099661 A1,2006.05.11,

审查员 刘迎鸣

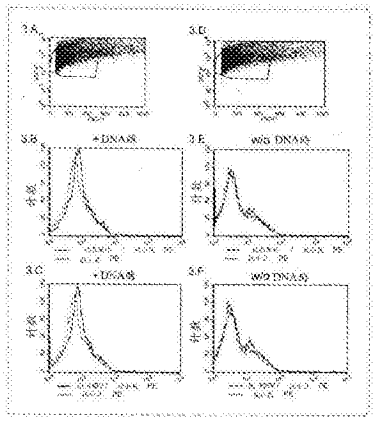
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

检测精细胞中细胞内感染原的方法

(57)摘要

本发明描述了用于使用免疫荧光结合流式细胞仪，调查精子中衣原体、病毒和其他感染原的存在的方法。此方法是通过使用一种DNA缓和过程，用于检测精细胞内的细胞内微生物体，以及用于检测附着于精子表面的微生物体。



CN 104303059 B

1.断裂DNA的酶在制造用于调查精子中细胞内病毒、衣原体、寄生物和其他感染性病原体的存在的方法的诊断试剂中的应用，该方法包括以下步骤：

-一种程序，用于

-使用所述断裂DNA的酶放松包括精子的精细胞的DNA的致密结构，

-使用荧光抗体或抗抗体，进行直接或间接的精细胞内免疫荧光，

-通过流式细胞术可视化并评价结果，

并且该方法的特征在于以下事实：放松该DNA的致密结构的步骤必须在免疫荧光之前进行。

2.根据权利要求1所述的应用，其中通过流式细胞术可视化并评价结果的步骤包括：用洗涤缓冲液中的7-氨基放线菌素D(7AAD)孵育细胞沉淀，以使得能够在1N和2N细胞之间进行辨别。

3.根据权利要求1或2中任一项所述的应用，其用于确定不育症、早期妊娠失败流产或胎儿损失的原因，并用于预防先天性感染或用于预防垂直传递，并且也用于调查男性生殖系统的炎症与感染。

4.根据权利要求1或2中任一项所述的应用，其具体用于调查以下感染原中的一种：巨细胞病毒(CMV)、单纯性疱疹病毒I(HSV I)、单纯性疱疹病毒II(HSV II)、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)、HHV6、HHV7、HHV8、细小病毒19、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、柯萨奇病毒、人类免疫缺陷病毒、腺相关病毒(AAV)、风疹病毒、HPV、衣原体、弓形体和诺瓦克病毒。

5.根据权利要求4所述的应用，其中，所述人类免疫缺陷病毒是HIV-1或HIV-2。

6.根据权利要求1或2中任一项所述的应用，其用于调查精子中衣原体的存在，结合使用相同的样品或关于不同的样品的精子发生图和培养。

7.根据权利要求1或2中任一项所述的应用，其中精子DNA的非常致密的DNA结构的放松是以DNA消化进行的。

8.根据权利要求1所述的应用，其中该断裂DNA的酶是DNA酶I。

9.根据权利要求1或2中任一项所述的应用，其中任何适当标记的抗抗体可被用于荧光。

10.根据权利要求9所述的应用，其中任何荧光染料可被用于荧光，以下中的任一项荧光染料处于其中：荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC)、氨基甲基香豆素乙酸酯(AMCA 350)、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(海洋蓝)、瀑布蓝、亚莉克莎蛍石405、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(太平洋蓝)、亚莉克莎蛍石430、瀑布黄、亚莉克莎蛍石488、藻红蛋白(PE)、藻红蛋白德克萨斯红(PE-德克萨斯红)、藻红蛋白-花色素苷5(PE-Cy5)、多甲藻素叶绿素蛋白(PerCP)、多甲藻素叶绿素蛋白-花色素苷5.5(PerCP-Cy5.5)、藻红蛋白-花色素苷7(PE-Cy7)、罗丹明TR、别藻蓝蛋白(APC)、亚莉克莎蛍石647、别藻蓝蛋白花色素苷7(APC-Cy7)、BD APC-H7、亚莉克莎蛍石700。

11.根据权利要求1或2中任一项所述的应用，其中包括一个外部免疫荧光的额外步骤。

12.用于调查精子内部病毒、衣原体、寄生物和其他病原体的存在的试剂盒，该试剂盒至少包括以下各项：

-可以放松精子细胞的DNA的DNA消化酶，

-适合用于对抗感兴趣的感染原的一种或多种抗体。

检测精细胞中细胞内感染原的方法

技术领域

[0001] 本发明描述了一种方法，用于使精液(即精子细胞群)经受分析，以检测精子内部的细胞内病毒、衣原体、寄生物和其他微生物，试图研究和确定低生育力和不育症的病因，以及预防先天性感染。整个程序是使用用于缓和DNA结构、用抗体靶向微生物和用流式细胞仪来评价结果的特定过程完成的。

背景技术

[0002] 低生育力是目前越来越常见的问题，影响到许多家庭。为解决这一问题，已开发出来许多方法，包括体外受精(IVF)。

[0003] 输卵管阻塞、无精子症和绝经期是低生育力的无可争议的原因。少精症和绝经前期是无精子症和绝经期的早期阶段，也是人们感兴趣的，因为它们是导致低生育力的渐进的重要因素。特别是少精症，应该是通过IVF容易解决的一个问题，因为一个单独的精子用于受孕应该是足够的。然而，在实践中，情况并非如此。

[0004] 对于精子，存在各种已被广泛研究的定性的缺陷，并且这些缺陷特别影响精子质量的两个评价参数：形态学和运动性。运动性为胚胎学家提供了IVF尝试的关于用于微受精的精子的适宜性的仅仅大致的信息。另一方面，精子形态是用于评价精子适合或不适合受精的一个更准确的标准。然而，精子形态不能直接用作对选择良好精子以用在IVF中作为所使用的精子的度量，因为精子样品的形态学特征在这个过程中被破坏。根据上述情况，显然有很多方法来评价精子样品(世界卫生组织人类精液特征的参考值，人类生殖更新(Human Reproduction Update)2009)，这些方法在观察低生育力的夫妇时被考虑到，这些夫妇中的许多会继续使用IVF的方法。

[0005] 精子样品的最终特征将是对每个检查的精子的所检测到的全部特定的形态异常的组合评价的结果。特征在于不存在这些异常的精子被归类为“合适”或“正常”。此外，还已经通过畸形精子症指数(TZI)给出生理数值，其测量每个异常精子形态异常的平均值。也可以通过测量样品中凋亡的精子的百分比，即已经进入程序性细胞死亡过程中的精子，以评估精子质量。

[0006] 然而，每一个精子异常可以归因于一个特定的原因。这种原因可以是微生物，例如在慢性前列腺炎的情况下，或其它因素如吸烟、肥胖、过度的体育锻炼、高温等。

[0007] 相反，病毒因素作为男性低生育力的一个原因到现在为止尚未得到医学界的十分关注。在2004年和2005年，在美国生殖免疫学杂志(American Journal of Reproductive Immunology)的两个出版物中，勒克斯梅迪卡斯S.A.(Locus Medicus S.A.)的研究人员(包括V.茨利瓦克斯(V.Tsilivakos)，本发明的发明人)描述了在有低生育力和/或流产病史的女性的血液中高数目的自然杀手(以下简称NK)淋巴细胞与亚临床的疱疹病毒血症(HSV1-2、EBV、CMV、HHV6和HHV7)的存在之间的相关性。

[0008] 随后，诸位发明人在流产的材料中观察到NK淋巴细胞大多聚集在着床部位，而这些妇女的血液NK水平是正常的。根据诸位发明人的理论，如果归因于通过精细胞(包括精

子)而源于男性的病毒(至少疱疹性)抗原的存在,在这种情况下的胚胎本身是抗原性的,这是可以解释的。这些抗原会被表达,并通过胎儿细胞呈现给女性的免疫系统从而引起NK效应。

[0009] 然而,当我们试图通过传统的诊断方法,如精子形态学或精液分析的其他参数,来建立病毒因素的存在时,我们发现这是行不通的。

[0010] 要解决的问题

[0011] 当一对夫妇到达不育症门诊时,正确的做法是调查问题的原因。许多症状和体征被牵连为不育症所涉及的因素,但它们中的许多不是主要原因,它们本身是其它因素的结果,这些因素通常本质上是传染性的,其根治或遏制可能有助于治疗。例如,我们知道,衣原体或其它微生物在输卵管中的存在可导致输卵管阻塞,先是暂时性的,但如果没有进行治疗性干预,则可以是永久的。同样,精细胞(包括精子)由于细胞凋亡而DNA片段化,这常是男性生殖道的不同部分的细菌性或可能是病毒性感染,以及其它因素,如氧化应激的结果。

[0012] 成功解决夫妻不育的问题,取决于对该问题的主要原因的解释的绝对精确,无论这对夫妻是否实现自然受孕或者使用某种辅助生殖。不幸的是,仅最近由个别研究人员(而不是由作为一个整体的医学界)承认病毒存在于精液的临床意义,如果的确这些病毒包含在最终使卵细胞受精的精子内,这个事实将变得甚至更具有临床相关性。在这种情况下,病毒感染可以通过垂直传播从精子传递到受精卵造成胎儿细胞和病毒细胞的同时增殖,然后它们可以聚居于器官和组织,在那里已知它们会导致出生缺陷,如神经系统中的疱疹病毒或心血管系统中的其它病毒的情况下。在我们看来,为了使感染(病毒)因子存在的不利影响发生,需要免疫系统对抗感染的失败。与此相反,如果女性的防御机制能够通过识别病毒抗原对抗感染(病毒)因子,这将导致受该病毒感染的胎儿细胞的破坏。

[0013] 胚胎细胞排斥的机制可能涉及那些通过NK细胞发生的,就它们在免疫学病因的第一个三月期流产过程中的作用而言,针对其已在过去的25年里造成了这么多不必要的麻烦。至少在疱疹病毒的情况下这可以是真实的,针对该疱疹病毒,NK细胞的激活是一个后续反应。此外,在最近的一个公开中,诸位发明人描述了希腊教师中不育症的高发病率。这可能是由于他们在童年高曝露于病毒感染,即更高浓度的病毒。此外,我们观察到处于长期关系的夫妻中更高流产发生,这可能表明对女性的部分的更强的免疫记忆。这将导致女性的免疫系统对男性伴侣的“熟知”病毒的更强的免疫反应,导致被感染的胚胎细胞的迅速破坏。不幸的是,现在还没有任何关于胚胎抗原性的国际研究。然而,诸位发明人认为,发育中的胚胎表达很少或不表达只限男性的抗原,这些抗原是通过男性发展的抗原并且女性生物体不会产生这些抗原从而它们识别为其自身的-至少直到第一个三月期的结束。

[0014] 关于配偶间不同的HLA分子,我们知道,它们的表达在与女性免疫系统直接接触的胎儿细胞中被下调。所以问题是在第一个三月期流产期间或在发生更早的并由此不能通过月经的延迟被感知到的流产期间女性生物体攻击的外来抗原是哪个。在未来,必要的是,国际科学界从事每一种情况下的男性亚临床病毒感染的(它是散发的或慢性的)临床意义的程度以及对其的适当处理,该感染可能导致病毒抗原垂直传播给胎儿。

[0015] 本发明的发明人列入这一因子已建立诸位发明人的以下观点,未考虑精细胞(包括精子)中的非病毒和其它污染物对应于对不育症的不正确和不充分的研究。

[0016] 因此,存在对用于检测精细胞(包括精子)内的感染原(infectious agent)的具有

高灵敏度和特异性的方法的巨大需要，但不幸的是，直到现在这还不是技术上可行的。

[0017] 其他方法

[0018] 直到现在，用于检测精液中的微生物(如衣原体)的方法已使用免疫荧光法(滑动安装的细胞悬浮液)，但这是具有非常低灵敏度的方法。也常使用检测血液中循环抗体的血清学ELISA法，但缺少对感染的定位的任何信息。

[0019] 微生物(包括支原体)当前是通过精液培养检测的。然而，为了培养细胞内的感染原，使用特定的细胞系和细胞培养设备以及严格的安全的实验室规定是必需的。这些增加的需求使得几乎无法基于日常地应用此技术。

[0020] 在近年来，分子技术(主要是聚合酶链式反应或PCR)的使用可被用于在从精子或精液的洗涤的细胞组分提取DNA之后检测衣原体和感染原。但还没有描述过通过扫描电子显微镜对精细胞(包括精子)的内部的细胞内病原体进行检测。

[0021] 最后，电子显微镜可检测单独附着到细胞膜外表面的微生物或病毒的存在(但非在细胞内的)。

[0022] 对于检测精液中的病毒，最有效的、现今可用的、由高灵敏度和特异性表征的方法是精液的洗涤的细胞组分的PCR。然而，这种技术的主要缺点是它不能辨别细胞外或细胞内寄生物，即所检测出的微生物是位于精子的外部还是内部，并且也不可以指示受感染的特定的细胞类型，无论它是精子或包含在精液中的其他类型的细胞，例如像白细胞或精细胞祖细胞。

[0023] 此外，针对病毒和/或弓形体的抗体的血清学检测不提供关于感染原在精细胞或精液的任何其他细胞组分的内部或外部的定位的任何信息。

[0024] 最后，通过荧光或显色原位杂交在细胞内检测微生物是可能的。然而，该方法具有低灵敏度，更费时，并且比本发明中所描述的方法更昂贵。

[0025] 公开和描述于本发明中的方法第一次允许感染原的细胞内检测，也就是说，那些位于精细胞(包括精子)内(在内部)的感染原。

[0026] 斯图尔特(Stuart)等人的专利申请，美国专利申请公开号US 2006/0099661 A1，题为“细胞内病原体的检测和量化”致力于对在该细胞的表面上以及细胞内(主要是在外周血细胞中)以及其他包括精子细胞的生物流体的衣原体的检测。在此专利中，诸位发明人描述了以下三个基本步骤：

[0027] a)获得该生物流体

[0028] b)用一种一级抗体来特异性识别在该细胞表面上的或细胞内的衣原体抗原以及

[0029] c)使用流式细胞仪分析该样品，

[0030] 并且从而，他们描述了通过使用在该专利中描述的所提议的方法，他们成功检测在外周血细胞中的衣原体。

[0031] 此外，根据通过使用化学TRITON-X在淋巴细胞内检测衣原体的所述的方法，美国专利申请公开号US 2006/0099661A1，题为“细胞内病原体的检测和量化”的作者声称该方法可以扩展到也在包括精细胞的其它细胞中检测衣原体。

[0032] 为了测试在所述现有技术中作出的假设，根据由发明人伊丽莎白S.斯图尔特(Elizabeth S.Stuart)和劳埃德H.塞姆普瑞维沃(Lloyd H.Semprevivo)所提出的实验方法，本发明的发明人进行了在US 2006/0099661 A1中描述的实验。然而，尽管在US 2006/

0099661 A1中表示的声明涉及将该方法扩展到对精细胞内的衣原体的检测，如我们在下图1的直方图中显示的，诸位发明人发现，遵循由斯图尔特和塞姆普瑞维沃所述的实验技术在精细胞中和被本发明的发明人公开的方法定性为“完全阳性”存在衣原体的已知样品上的细胞内衣原体检测是不可能的。

[0033] 根据诸位发明人的结果，表示根据由斯图尔特和塞姆普瑞维沃所述的程序所使用的用于检测衣原体的精子样品的曲线与对照相比并没有表现出向右的移位(图1.B)-这两条曲线是无法区分的。这意味着该方法检测不到该样品中衣原体的存在。本发明的发明人把斯图尔特和塞姆普瑞维沃的检测精细胞内衣原体的方法的失败归于缺少细胞的酶处理(用DNA酶)，该处理是当前发明的发明人建议的并已被证明是检测精细胞内的任何传染性因子(细菌或病毒)的程序的一个必需步骤并且该程序在是本发明的方法的核心和基本要素。

[0034] 此外，本发明的发明人的结果表明，就精子的研究而言，尤其是当使用直接荧光法时，斯图尔特&塞姆普瑞维沃的方法的特征是低灵敏度和低特异性。这示于图2中，其示出了通过使用在斯图尔特&塞姆普瑞维沃的专利申请中提出的方案，在阴性对照精子样品内部检测到对小鼠抗原具有特异性的抗CD3抗体，而理论上该抗体不应该结合到精细胞中的任何抗原(低特异性)。换句话说，斯图尔特&塞姆普瑞维沃提出的方法产生错误的和误导性的结果。

[0035] 以上结果表明，由斯图尔特等人的专利申请US 2006/0099661 A1所提出的用于在精细胞中检测细胞内衣原体的方法未对本发明指出的问题提供一种解决方案。

发明内容

[0036] 根据诸位发明人的观点，每当存在以下的一个或多个病史时，对精子中假定的传染因子的详尽研究是必要的：早期妊娠失败、生化妊娠、少精症、弱精症或精子畸形、不成功的IVF尝试、低生育力、或一般的低生育力预防。

[0037] 特别是对于低生育力预防，首要重点是精子中衣原体检测，并且我们选择这样做与精子发生图和精液培养相结合，以也检测其他微生物的存在。

[0038] 本发明描述了通过使用直接或间接的免疫荧光方法，随后用流式细胞仪可视化和评估，来检测和研究精子内部的病毒、衣原体、寄生物和其他微生物的存在的方法。

[0039] 本发明描述的是在细胞内部进行该检测，用于检测存在于精子内部的微生物。在本发明中所建议的方法是免疫荧光结合流式细胞术的评估结果，通过使用缓和DNA(例如DNA消化)的特定处理。

[0040] 本发明的特征是，用于调查精子中细胞内的病毒、衣原体、寄生物和其他感染性病原体的存在的所述的方法包括以下步骤：

[0041] -缓和包括精子的精细胞的DNA的致密结构，

[0042] -直接或间接的精细胞内免疫荧光，

[0043] -用流式细胞术可视化并评价结果。

[0044] 我们想强调的是，DNA致密结构的DNA缓和发生在免疫荧光前对通过特异性抗体使目标抗原可检测是非常重要的。

[0045] 有利的是，通过流式细胞术可视化并评价结果的步骤包括：用WB中的7-氨基放线

菌素D(7AAD)孵育细胞沉淀,以使得能够在1N和2N细胞之间进行辨别。

[0046] 优选地,进行本发明中所描述的方法用于确定低生育力、早期妊娠失败或流产或胎儿损失的原因。此外,它可被用于预防和研究先天性感染或用于预防垂直传播和用于检测炎症和男性生殖系统感染,例如附睾炎。

[0047] 本发明的方法还可以检测以下病原体中的一种的特定存在:巨细胞病毒(CMV)、单纯性疱疹病毒I(HSV I)、单纯性疱疹病毒II(HSV II)、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)、HHV6、HHV7、HHV8、细小病毒19、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、柯萨奇病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)、腺相关病毒(AAV)、风疹病毒、HPV、衣原体、弓形体和诺瓦克病毒。

[0048] 特别地,关于检测精子中的衣原体,当前的方法可以与用于检测其他病原体的精子发生图和精液培养相结合,具有以下显著优点,这些可以在同一样品上或在不同的样品上进行。

[0049] 优选地,对非常致密的精子DNA的DNA结构的缓和是用DNA消化进行的,并导致DNA片段化。

[0050] 有利的是,DNA消化是用裂解DNA的酶来完成的。

[0051] 例如,该酶可以是DNA酶I。

[0052] 对于免疫荧光,可以使用任何合适的荧光抗体或抗抗体。为了这个目的,可以使用任何荧光染料,包括现今已知的以下中的任何一种:荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC)、氨基甲基香豆素乙酸酯(AMCA 350)、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(海洋蓝)、瀑布蓝、亚莉克莎莹石405、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(太平洋蓝)、亚莉克莎莹石430、瀑布黄、亚莉克莎莹石488、藻红蛋白(PE)、藻红蛋白德克萨斯红(PE-德克萨斯红)、藻红蛋白-花色素苷5(PE-Cy5)、多甲藻素叶绿素蛋白(PerCP)、多甲藻素叶绿素蛋白-花色素苷5.5(PerCP-Cy5.5)、藻红蛋白-花色素苷7(PE-Cy7)、罗丹明TR、别藻蓝蛋白(APC)、亚莉克莎莹石(ALexa Fluor)647、别藻蓝蛋白花色素苷7(APC-Cy7)、BD APC-H7、或亚莉克莎莹石700。

[0053] 本发明的方法可包括用于检测表面抗原的一个额外步骤。

[0054] 本发明还描述了使用本发明的方法用于精子内检测精子内部的衣原体、病毒、寄生物和其他病原体的试剂盒的开发和用途。该试剂盒应必然包括可以缓和精子细胞的DNA的一种物质。这种物质例如可以是消化DNA的酶,例如该酶可以是DNA酶I。另外,在本发明中公开的试剂盒应包括针对特定病原体的一种或多种抗体,该抗体的存在被要求识别。上述抗体可被荧光染料(例如以上所述的这些)直接标记。如果这些病原体的特异性抗体没被标记,应包括识别该第一特异性抗体的一种第二荧光染料标记的或生物素标记的抗体。

附图说明

[0055] 本发明可以通过使用下面的附图来说明。

[0056] 在图3中,说明了用流式细胞仪进行的沙眼衣原体和HSV抗原的精子内检测。在图3A、3B、3C中,在DNA酶I消化后观察对特异性抗原的检测。相反,在图3D、3F、3G中,其中没有在前的DNA酶I消化,不存在这样的检测。

[0057] 在图1中,示出了根据斯图尔特等人的专利申请号US 2006/0099661 A1所述的方案(对于其它细胞类型)进行的精子内部衣原体检测的失败。根据本发明,在DNA消化后相同的样品被表征为强阳性的(数据未示出)。

[0058] 图2说明了根据斯图尔特等人的专利申请号US 2006/0099661 A1所述的方案(对于其它细胞类型),抗体特异性的丢失。针对小鼠CD3的一种抗体结合,非特异性结合到精子,导致荧光向右移位。

具体实施方式

[0059] 本发明的一个实施例的实例如下:

[0060] 1.固定包括精子的精细胞

[0061] 在收集和液化精液之后,将精子离心,并在4℃下用4%的多聚甲醛(PFA)固定30min。PFA通过交联蛋白质起作用,从而灭活病原体,并且固定化已经连接到精子的推定的自抗体,从而使它们可检测,如果这是希望的话。在一些罕见的情况下,一些抗原表位可能会被改变或破坏使它们无法被某些抗体检测。在这种情况下,可以在固定之前进行表面染色。此外,PFA固定保持了细胞的物理特性:即在固定之后,这些细胞表现出与在分析过程中用流式细胞术进行的所显示的相同的散射特性。此外,PFA固定允许一个细胞外或细胞内染色程序的后续应用。

[0062] 2.重要提示:在用该病原体孵育一种具体的抗体之前,它会识别并与之结合,这对该程序是非常重要的,并且对于首先进行缓和或放松该精子的致密DNA结构是必要的。这个过程可以通过任何可放松DNA结构的方法来实现,除了别的之外,用具有放松精子的DNA的致密结构的能力的DNA消化进行。放松DNA的这一过程可用可实现相同的结果的任何其他方法,无论是机械的、热的、电解的方法或使用还原剂如β巯基乙醇、二硫苏糖醇、三(2-羧乙基)磷盐酸盐进行。这可以是用于DNA消化的一种酶的用途。在本说明书中给出的具体实例中,这样的物质的实例是一种DNA消化酶。在本说明书中所使用的具体实例中,作为这样的DNA消化物质,我们已使用酶DNA酶I。图3说明不经DNA酶I消化步骤的病原体检测的失败。

[0063] 3.精子内染色(间接)

[0064] 在我们的实例中使用间接染色,因为它比直接染色成本更低。然而,如果如下文所述替代地直接使用共轭的抗体,本发明也可以运行。

[0065] A.将细胞的一部分进行离心,再悬浮,并用含有4%PFA和0.1%皂素(培养基A)的100-500μl磷酸盐缓冲液(PBS)孵育30min。然后将这些细胞用含有0.1%皂素和2%胎牛血清(FCS)的2ml PBS(洗涤缓冲液-WB)洗涤。弃去上清液,并将沉淀用含10%二甲亚砜(DMSO)和0.1%皂素的100-500μl PBS孵育10min。在用WB洗涤后,在4℃,将该沉淀用100-500μl培养基A固定。在10min孵育后,将这些细胞用WB洗涤,弃去上清液,将沉淀重新悬浮,并在37℃用DNA酶I(500μg/ml)孵育30min。最后将细胞用WB洗涤,弃去上清液,并将沉淀用滴定量的、对于以下病原体中的一种具有特异性的具体抗体孵育:

[0066] a.巨细胞病毒(CMV)

[0067] b.单纯性疱疹病毒I(HSV I)和/或单纯性疱疹病毒II(HSV II)

[0068] c.爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)

[0069] d.HHV6

[0070] e.HHV7

[0071] f.HHV8

[0072] g.细小病毒19

[0073] h.乙型肝炎病毒

[0074] i.丙型肝炎病毒

[0075] j.柯萨奇病毒

[0076] k.HIV(HIV I、HIV II)

[0077] l.腺相关病毒(AAV)

[0078] m.风疹病毒

[0079] n.HPV

[0080] o.诺瓦克病毒

[0081] p.衣原体

[0082] q.弓形体。

[0083] 将细胞用抗体孵育，在这些病原体中的每一种的单独的管或在同一个管中进行，其允许同时检测病原体，其前提是存在具有离散的荧光团的直接共轭的抗体，其发出彼此形成对比的颜色。

[0084] 在4℃下孵育30min后，将这些细胞用WB洗涤并弃去上清液。

[0085] B.将细胞沉淀再悬浮并用50μl针对来自动物(该第一抗体是从该动物开发的)的免疫球蛋白的多克隆荧光团共轭抗体进行新的孵育，如下。可以使用任何荧光团。以下是现今最公知的荧光团，其被示意性地提及但不应被认为是对我们选择荧光团的限制：

[0086] 荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC)、氨基甲基香豆素乙酸酯(AMCA 350)、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(海洋蓝)、瀑布蓝、亚莉克莎萤石405、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(太平洋蓝)、亚莉克莎萤石430、瀑布黄、亚莉克莎萤石488、藻红蛋白(PE)、藻红蛋白德克萨斯红(PE-德克萨斯红)、藻红蛋白-花色素苷5(PE-Cy5)、多甲藻素叶绿素蛋白(PerCP)、多甲藻素叶绿素蛋白-花色素苷5.5(PerCP-Cy5.5)、藻红蛋白-花色素苷7(PE-Cy7)、罗丹明TR、别藻蓝蛋白(APC)、亚莉克莎萤石647、别藻蓝蛋白花色素苷7(APC-Cy7)、BD APC-H7、亚莉克莎萤石700。

[0087] 随后将这些细胞在4℃孵育30min，并且然后将这些细胞用2ml WB洗涤。如果有必要进行白细胞研究，该程序继续到下一步骤。替代地，该程序进行到其中收获这些细胞的步骤。

[0088] 白细胞染色的可选步骤

[0089] 如果我们面临是否有微生物存在于精液白细胞中的问题，则将这些样品用针对白细胞抗原的直接共轭的抗体进行孵育来评估白细胞内的病原体的可能存在。附着于该抗体的荧光团必须不同于用于病原体检测的其他荧光团。随后在4℃下孵育30min，并且然后进行另外2ml WB洗涤。弃去上清液，并将细胞重新悬浮。此外，在用WB中的7-氨基放线菌素D(7AAD)孵育后，1N和2N细胞间的辨别是可行的。在5min孵育后，将这些细胞准备好在流式细胞仪中进行采集。

[0090] 病原体的直接免疫分型

[0091] 替代地，如果针对推定的病原体的特异性抗体直接与荧光团共轭，则可以省略B阶段，如上所述。此外，每个特异性抗体可以共轭生物素并且对其的检测通过随后用链霉亲和素-荧光团复合物孵育来实现。作为生物素的替代，可使用任何其它模式的荧光团共轭。可以使用任何荧光团，包括但不限于下列已知的荧光团：荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC)、氨基

甲基香豆素乙酸酯(AMCA 350)、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(海洋蓝)、瀑布蓝、亚莉克莎萤石405、6,8-二氟-7-羟基香豆素衍生物(太平洋蓝)、亚莉克莎萤石430、瀑布黄、亚莉克莎萤石488、藻红蛋白(PE)、藻红蛋白德克萨斯红(PE-德克萨斯红)、藻红蛋白-花色素苷5(PE-Cy5)、多甲藻素叶绿素蛋白(PerCP)、多甲藻素叶绿素蛋白-花色素苷5.5(PerCP-Cy5.5)、藻红蛋白-花色素苷7(PE-Cy7)、罗丹明TR、别藻蓝蛋白(APC)、亚莉克莎萤石647、别藻蓝蛋白花色素苷7(APC-Cy7)、BDAPC-H7、亚莉克莎萤石700。

[0092] 4.采集和结果评估

[0093] 在流式细胞术装置中获取样品并使用合适的软件来执行数据分析。使用基于其大小和复杂性和/或抗原(如白细胞抗原)的表达的区域组合对这些细胞进行门控。该分析侧重于精子内的或精子的其他细胞组分内的病原体的推定存在。此外,使用基于白细胞抗原的表达的合适的区域,在白细胞中对这类病原体的检测是可行的。

[0094] B.表面免疫染色

[0095] 除了精子内染色,对推定的胞外病原体的检测也是可行的。将细胞的第二个部分进行离心,弃去上清液,并将这些细胞均匀分布于含有滴定量的一种具体抗体(特异于每种病原体)的管中。在4℃下孵育30min之后,将这些管用含有2%FCS的PBS(PBS-2%FCS)洗涤,并弃去上清液。接着,将这些细胞重新悬浮,并用50μl针对该动物(该第一抗体是从该动物开发的)的免疫球蛋白的多克隆荧光团共轭抗体进行再次孵育。在4℃下孵育30min之后,将这些管用含有2%FCS的PBS(PBS-2%FCS)洗涤,并弃去上清液。将这些细胞重新悬浮,并置于流式细胞术装置中,用于采集和分析。

[0096] 附图详细说明

[0097] 具体为:

[0098] 在图3的2D散点图中,精子(FSC-H)的大小是相对于它们的复杂性(SSC-H)呈现的,其中定义了一个外壳区域R,以使得可以研究富含精子的细胞群。

[0099] 根据上述未使用DNA酶的程序,分别检测一种衣原体抗原和一种疱疹抗原的抗体的特异性荧光呈现在图1中的直方图3E和3F中。此外,在相同的直方图中,也通过标记的抗抗体显示出了对照的荧光。这两条曲线的比较表明,没有检测到抗原,即没有检测到感染原。

[0100] 来自对同一外壳区域R中的精子的研究的相同参数示于图3的直方图3A、图3B和图3C中,但在这种情况下,DNA酶孵育已经由上文详述。数据分析表明,在DNA酶的存在下,检测精子中的感染原是可行的,如通过与对照相比荧光向右移位表现的(对照是由相同的步骤(省略使用感染原特异性抗体)处理的)。

[0101] 以上在本说明书中的现有技术章节中详述了图1和2。

[0102] 本发明的方法的优点

[0103] • 如在本发明中所描述的,用于检测包括精子的精细胞内部的感染原的方法的主要优点是其高灵敏度,条件是满足关于细胞固定、膜通透性以及最重要的用一种DNA消化酶酶促地放松DNA的致密结构的技术和条件。在由本发明的发明人进行的平行调查中,发现该方法检测了感染原的存在,甚至在其中对同一样品进行的分子(PCR)检测测试是阴性的情况下。此外,通过使用其中使用了特殊的珠子并可将荧光水平匹配到抗原数目的技术,有可能构造一个曲线,该曲线关联荧光强度与每个被感染的包括精子的精细胞的微生物或病毒

的数目。通过本发明提出的方法允许研究大量的细胞(例如20,000)/每个样品并允许样品的追溯复检。通过所提出的方法提供的这种数量优势将假阴性结果的可能性(检测感染原的失败)最小化。

[0104] • 通过使用阴性对照以及当然通过使用单克隆抗体(特异地检测并与每种微生物或病毒的具体分子的单个特异位点反应的试剂)已经建立和确保该方法的高特异性。此外,通过散射特性评价和/或在补充抗体(即抗-CD45)的帮助下,可以确认包括精子的精细胞中微生物的存在。也清楚地表明,感染原附着到细胞膜的外表面上,而不是附着到包括精子的精细胞的内部;这些信息可以具有很大的临床意义。

[0105] • 所描述的方法允许对抗生素或抗病毒治疗的有效性进行评估。如通过检测到的样品中的微生物的递减数目所指示的,通过测定感染的回归来监测病原体状态是有用的(如四环素治疗后衣原体)。

[0106] • 固定的样品可以被安全地长期保存直到进行测试。固定的样品的装运也是可行的。由于本发明中所描述的用于研究精液的方法需要使用流式细胞术,缺乏此技术的实验室不能利用该方法。为了处理这个问题,在本发明中所描述的方法允许不损失灵敏度或特异性下安全转移或装运固定的样品(在不同位置和实验室之间)。此外,安全运输样品的能力允许在流式细胞术的技术失败的情况下在不同实验室中进行样品的复检。最后,将所得到的数据由该设备以电子方式存储,并因此可在任何时间用于重新评估。

[0107] • 所述方法的特征在于非常低的成本,该成本比等效的PCR测试肯定更低。

[0108] • 所述方法的特征还在于非常快的实验室周转时间,因为可在同一天获得测试结果。

[0109] 此外,本发明第一次描述了使用特异性免疫荧光技术用于检测包括精子的精细胞中的细胞内感染原并通过流式细胞术评价测试结果的方法。

[0110] -通过使用"放松"细胞内的DNA结构的DNA消化酶,精子的细胞内分析成为可能。从开始到现在为止,本发明的发明人已经将这些试剂(抗体)不能检测精子内的微生物(靶抗原)归因于存在于该细胞中的该区域的DNA的具体的和非常高的浓度。其结果是,本发明的发明人认为有必要通过消化"放松"该DNA,以清除抗体接触并结合到靶抗原(微生物)的路径。

[0111] -至于对细胞内或细胞膜的外表面上的微生物的检测而言,本发明的发明人认为,这是两个不同类型的方法,有不同的临床解释。例如,诸位发明人将亚临床的病毒血症和衣原体血症(chlamydiaemia)归因于通过渗透血睾屏障的精细胞祖细胞感染。另一方面,微生物的膜定位主要与精子的释放途径(附睾、前列腺、尿道)的感染有关。

[0112] 关于自然受孕,合子细胞似乎没有被保护以防止细胞内感染原的垂直传播,也就是说,感染原通过精子对胎儿的直接传递,而膜结合的感染原的传播可以更易被阻止。例如,根据艾那得(Aynaud)等人(精液中的单纯性疱疹病毒、巨细胞病毒和人乳头状瘤病毒DNA的频度(Frequency of herpes simplex virus,cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen),艾那得(Aynaud)等人,国际STD AIDS杂志(Int J STD AIDS),2002年8月;13(8):547-50),精浆防止病毒附着到细胞膜上。

[0113] 本发明的发明人认为细胞表面上的感染原是垂直传播的一个相对较小的风险因素,由于这些因素如精浆、抗体、蛋白酶等的影响。相反,他们认为完整的细胞内感染原对胎

儿的垂直传播针对，如先天疾病、不育或早期流产的发展等问题具有极大的风险。

[0114] 尤其在自然受孕(不是胞浆内精子注射)时，只有精子头部进入卵子而该细胞的其余部分(占该精子细胞表面的大部分)被排除在外。其结果是，细胞内感染原不可避免地进入卵子，另一方面，对于膜结合的微生物同样是不正确的，因为精子细胞膜在受精过程中保持在合子外部。

[0115] 因此，本发明的发明人认为在研究从精子到胎儿的垂直传播中对细胞内感染原的调查最为重要。

[0116] 在表1中，我们呈现了五个月时间段的来自在勒克斯梅迪卡斯S.A.的实验室中测试的样品的数据以及来自勒克斯梅迪卡斯S.A.的细胞生物学和免疫学实验室的初步结果。

[0117]

	样品总编号	阳性		完全阳性	
		(N)	(%)	(N)	(%)
sCT	310	204	65,81	14	6,86
cCT	329	219	66,57	49	22,37
CMV	273	125	45,79	19	15,20
EBV	243	59	24,28	1	1,69
HSV I/II	242	103	42,56	7	6,80

[0118] 表1显示了使用流式细胞术对精子样品进行的感染原检测。sCT:膜结合沙眼衣原体，cCT:细胞内沙眼衣原体，CMV:巨细胞病毒，EBV:爱泼斯坦巴尔病毒，HSV I/II:单纯性疱疹病毒。

[0119] 我们认为在其中检测到阳性精子的样品中，该样品的5%以上是“完全阳性”。

[0120] 以上结果表明:发现显著百分比的所测试的样品被细胞内衣原体和/或病毒感染。所检测的细胞内感染不能以其他方式发现。阳性结果(即感染检测)使感染能立即得到合适的抗生素治疗，如下表2中显示的。

[0121]

	案例总编号	衣原体装载的显著减少	
		(案例编号)	%
sCT	37	20	54,05
cCT	37	27	72,97

[0122] 表2.在“完全阳性”的样品中在对沙眼衣原体感染进行抗生素治疗之前和之后，以流式细胞术显示衣原体负荷显著减少的案例的编号。sCT:膜结合沙眼衣原体，cCT:细胞内

沙眼衣原体

[0123] 更具体地，表2显示，在37分之20(54,05％)的、其中检测到膜结合的沙眼衣原体的“完全阳性”的样品中，衣原体负荷在抗生素治疗之后减少。此外，表2表明，在细胞内检测沙眼衣原体的案例下，显示衣原体负荷减少的样品百分比甚至更高，如37之27(72,97％)的案例显示在用抗生素治疗后得到改善。

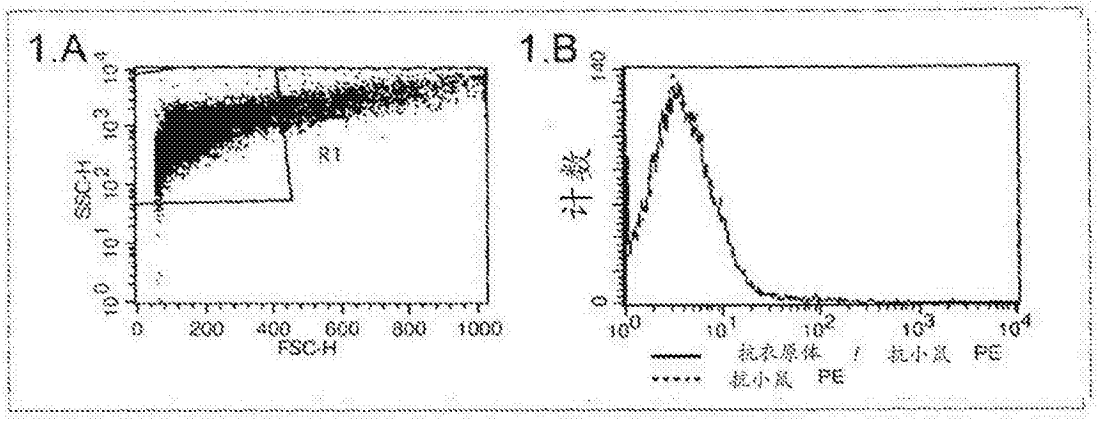

1.A
SSC-H
FSC-H
R1
0
200
400
600
800
1000
1.B
计数
140
0
抗小鼠 PE

图1

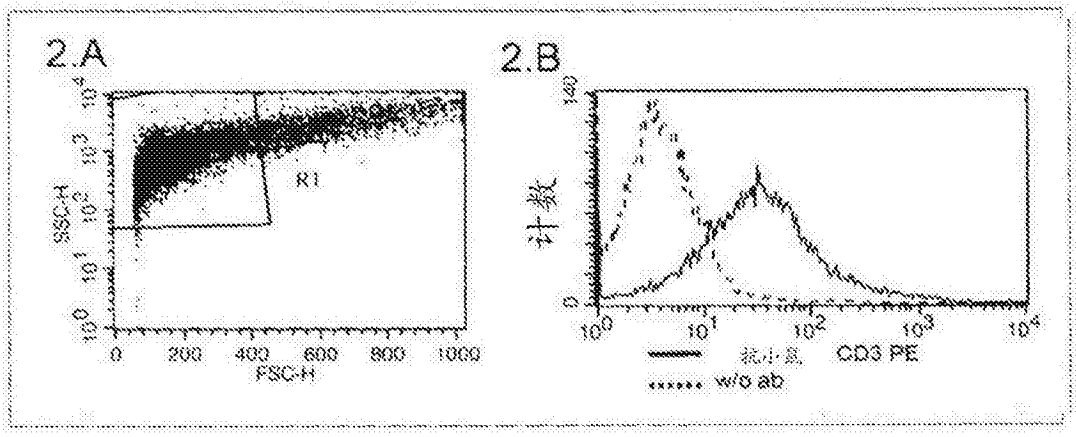

2.A
SSC-H
FSC-H
R1
0
200
400
600
800
1000
2.B
计数
140
0
抗小鼠 CD3 PE
w/o ab

图2

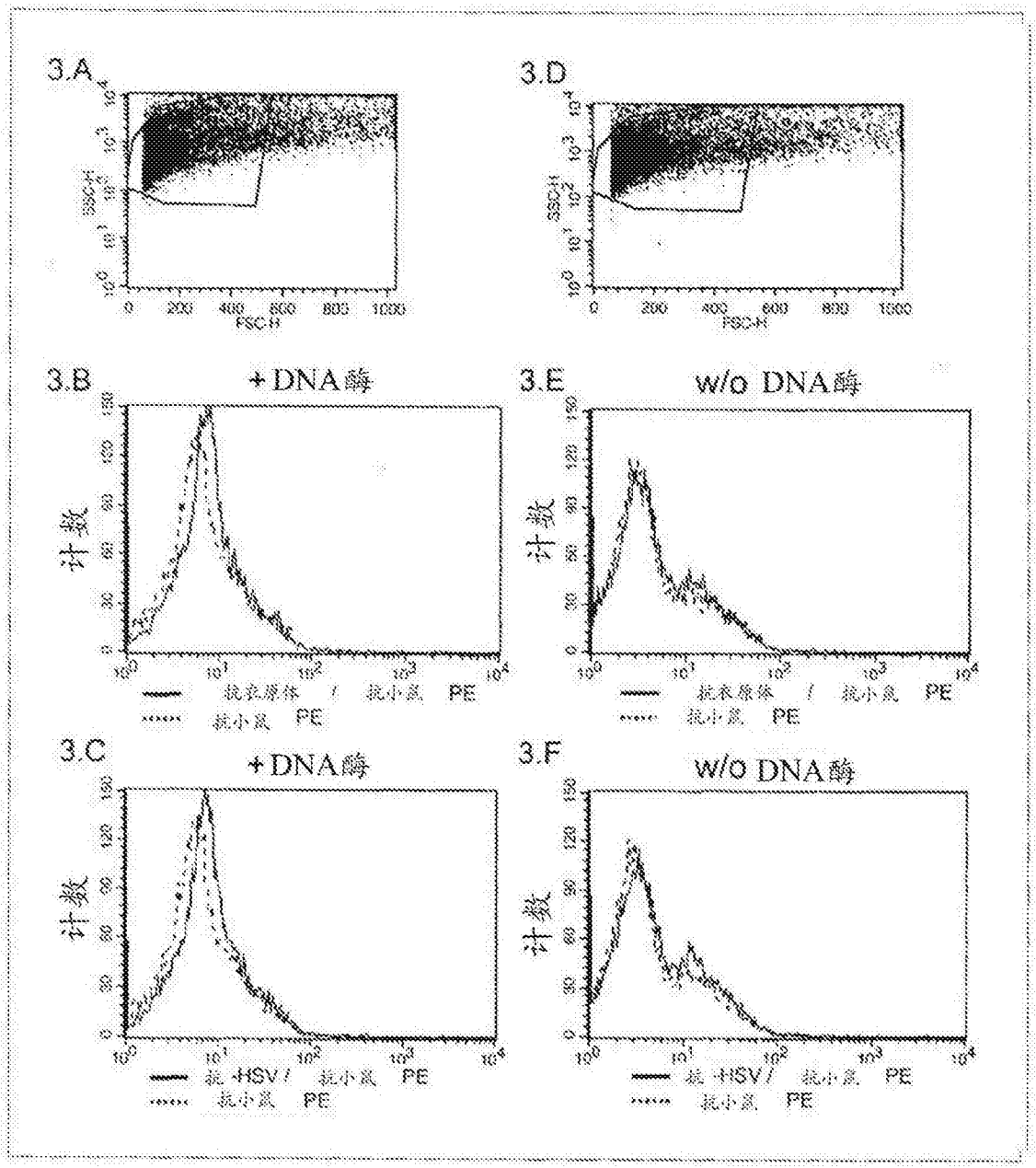

3.A
SSC-H
FSC-H
3.D
SSC-H
FSC-H
3.B
+DNA酶
计数
抗衣原体 / 抗小鼠 PE
抗小鼠 PE
3.E
w/o DNA酶
计数
抗衣原体 / 抗小鼠 PE
抗小鼠 PE
3.C
+DNA酶
计数
抗-HSV / 抗小鼠 PE
抗小鼠 PE
3.F
w/o DNA酶
计数
抗-HSV / 抗小鼠 PE
抗小鼠 PE

图3