

EpiScreen Plus™

Лабораторный тест для количественного определения содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в сперме (семенной плазме) человека (25 тестов)

Документ №: FP09 I87 R01 B.3

Дата издания: 19.01.2017 г.

СОКРАЩЕНИЯ

CLSI – Институт клинических и лабораторных стандартов.

CV – коэффициент вариации

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

НАГ – нейтральная альфа-глюкозидаза

ОП – оптическая плотность

PNP – пара (4)-нитрофенол

PNPG – пара (4)-нитрофенил-альфа-D-глюкопиранозид

SDS – натрия додецилсульфат

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

EpiScreen Plus™ представляет собой диагностический набор для лабораторной диагностики, предназначенный для количественного определения содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в сперме (семенной плазме) человека. С помощью одного набора EpiScreen Plus™ можно измерить ферментативную активность не менее 25 образцов. Только для профессионального использования.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Основная доля активности альфа-глюкозидазы в сперме, а конкретнее – ее нейтрального изофермента, зависит от секреции придатками яичка (1). У пациентов с азооспермией и нормальным уровнем андрогенов в периферической крови активность нейтральной альфа-глюкозидазы в семенной плазме является надежным маркером вклада придатков яичка в эякулят.

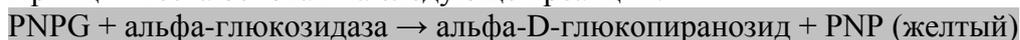
У мужчин с азооспермией при двухсторонней обструкции между придатками яичка и эякуляторным каналом наблюдаются очень низкая активность альфа-глюкозидазы в семенной плазме (2). В то же время, если азооспермия вызвана нарушениями процесса сперматогенеза (задержкой созревания сперматозоида) или обструкцией между придатками яичка и сетью яичка, или в самой сети яичка, активность альфа-глюкозидазы находится в норме. Таким образом, определение содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в семенной плазме нормально вирилизированных мужчин с азооспермией позволяет дифференцировать основные причины данного состояния (3, 4).

Низкая активность нейтральной альфа-глюкозидазы в семенной плазме пациентов с олигозооспермией может отражать частичную обструкцию придатков яичка, ассоциированную с инфекциями или воспалительным заболеванием (2, 5). Ферментативная активность у пациентов с нормальной концентрацией сперматозоидов коррелирует с результатами окрашивания по Шору средней части и хвоста сперматозоида, что отражает изменения в мембране сперматозоида, вызываемые эпидидимальной секрецией (5).

Тест EpiScreen Plus™ может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Принцип теста основан на следующей реакции:



При определенных условиях (рН=6,8; Т=37 °С), 1 МЕ (международная единица) альфа-глюкозидазы за одну минуту высвобождает 1 мкМ PNP (пара (4)-нитрофенола) из субстрата PNPG (пара (4)-нитрофенил-альфа-D-глюкопиранозид) (7). Желтое окрашивание PNP можно измерить спектрофотометрически на длине волны 405 нм. Активность альфа-глюкозидазы выражается в виде МЕ/л (или мМЕ/мл).

Реакционный буфер содержит SDS (натрия додецилсульфат), который селективно ингибирует кислотную форму альфа-глюкозидазы, источником которой является предстательная железа. Это позволяет проводить специфичное определение активности нейтрального фермента (6).

Ингибирование: Глюкоза ингибирует альфа-глюкозидазу, присоединяясь к моносахарид-связывающему участку альфа-глюкозидазы (8). Данный процесс ингибирования зависит от рН и дозы, и лежит в основе приготовления контрольных проб спермы (семенной плазмы).

ТИПЫ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить на свежих или замороженных/размороженных пробах спермы и семенной плазмы.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

С помощью одного набора EriScreen Plus™ можно измерить ферментативную активность не менее 25 образцов (включая образцы для коррекции фона).

- Реагент 1 (5 мл): реакционный буфер (рН 6,8), содержащий 1% SDS
- Реагент 2 (0,25 мл): 50X раствор субстрата (PNPG в ДМСО)
- Реагент 3 (5 мл): раствор ингибитора (реакционный буфер, содержащий глюкозу)
- Реагент 4 (60 мл): останавливающий буфер (0,02 М NaOH)
- Реагент 5 (1 мл): основной раствор стандарта (5 мМ PNP)
- Реагент 6 (60 мл): буфер для разбавления стандартов (0,02 М NaOH + 0,1% SDS)

Сертификат анализа и паспорт безопасности (MSDS) доступны по запросу или могут быть загружены с веб-сайта www.fertipro.com.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Планшетный или кюветный фотометр (фильтр 405 нм)
- Дозаторы, наконечники
- Микропланшет
- Пробирки Эппендорфа на 1,5 мл
- Водяная баня /термошейкер (*вместо бани может использоваться твердотельный нагреватель (напр., для ПЦР)*)

ХРАНЕНИЕ, ТРАНСПОРТИРОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

Набор можно транспортировать или хранить в течение короткого периода при повышенных (до 5 суток при 37 °С) и очень низких (до 2 дней при -18 °С) температурах.

Набор EriScreen Plus™ следует хранить при температуре 2-8 °С в защищенном от света месте. Набор годен к использованию в течение 24 месяцев с даты производства. Не использовать после истечения срока годности.

Срок хранения вскрытых флаконов составляет 13 месяцев.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Параметры валидации были рассчитаны в соответствии с новейшими руководствами CLSI (9,10).

<u>Диапазон измерения:</u> 2,32 – 144 мМЕ/мл	
<u>Коэффициент вариации в пределах одного анализа:</u> 3,08 %	<u>Чувствительность:</u> 96,0 % *
<u>Коэффициент вариации для серии анализов:</u> 10,52 %	<u>Специфичность:</u> 93,6 % *
<u>Точность в пределах одного набора:</u> пул образцов с низкой активностью: 0,96 мМЕ/мл; пул образцов с высокой активностью: 3,70 мМЕ/мл	
<u>Нижнее пороговое значение активности:</u> 6,35 мМЕ/мл 20 мМЕ/эякулят (в случае коррекции на объем эякулята)	

* вазэктомированные/нормозооспермические

ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

Не используйте продукт, если защитный колпачок флакона снят или поврежден при доставке продукта. При хранении при температуре 2-8 °С в Реагенте 1 возможно выпадение осадка, который исчезает после предварительного нагревания до 37 °С.

МЕТОД

Примечание 1: ВОЗ рекомендует применять для коррекции фона только две внутренние контрольные пробы. Поскольку вариация фона в образцах спермы достаточно велика ($\pm 20\%$), рекомендуем готовить отрицательную контрольную пробу для каждого образца спермы (семенной плазмы) для корректной и воспроизводимой коррекции фона.

Примечание 2: В тесте используется нагрев реагентов и образцов. Для оптимального прогрева проб всегда используйте водяную баню с терморегулятором или термошейкер/твердотельный нагреватель для реакционных пробирок. НЕ проводите инкубацию в суховоздушном инкубаторе, поскольку это может отрицательно повлиять на результаты анализа.

Выполните следующие шаги:

1. Нагреть Реагенты 1, 2 и 3 до 37 °С в течение 30 мин в водяной бане.
2. Для каждого анализируемого образца спермы (семенной плазмы):
 - Приготовить реакционный раствор: 3 мкл раствора субстрата (Реагент 2) в 147 мкл реакционного буфера (Реагент 1).
 - Приготовить ингибирующий раствор (= для отрицательного контроля): 3 мкл раствора субстрата (Реагент 2) в 147 мкл раствора ингибитора (Реагент 3).
3. Внести по 20 мкл каждого образца спермы (семенной плазмы) в две пробирки типа Eppendorf на 1,5 мл.
4. Добавить 130 мкл реакционного раствора в одну пробирку и 130 мкл ингибирующего раствора в другую (для отрицательного контроля).
5. Перемешать на вихревой мешалке и инкубировать ровно 2 ч при 37 °С.
6. Во время инкубации образцов спермы (семенной плазмы) приготовить растворы для построения калибровочной (стандартной) кривой PNP следующим образом:
 - a. Приготовьте стандартный раствор с самой высокой концентрацией (200 мкМ) путем разбавления 100 мкл основного раствора стандарта (Реагент 5) в 2400 мкл буфера для разбавления стандартов (Реагент 6).
 - b. Используйте этот раствор для приготовления других стандартов, как указано в нижеприведенной таблице. Реагент 6 (без разведений/добавок) используется как «нулевой» стандартный раствор (бланк, пустая проба).

Таблица: Разведения стандартов PNP для калибровочной кривой

Конечная концентрация (мкМ) стандарта PNP	Стандарт «200 мкМ» (мкл)	Реагент 6
200 мкМ	500 мкл	0 мкл
150 мкМ	375 мкл	125 мкл
100 мкМ	250 мкл	250 мкл
50 мкМ	125 мкл	375 мкл
10 мкМ	25 мкл	475 мкл
0 мкМ (=бланк)	0 мкл	500 мкл

7. Через 2 ч инкубации образцов (реакционного образца и отрицательного контроля) остановить реакцию путем добавления 1 мл останавливающего буфера (Реагент 4) и перемешать с использованием вихревой мешалки (вортекса).

8. Внести по 200 мкл всех стандартов (приготовленных на шаге 6) и образцов в лунки планшета.

9. Измерить оптическую плотность (ОП) на длине волны 405 нм.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматизированного расчета результатов рекомендуется использовать таблицу Excel, которую можно скачать с сайта FertiPro:

<http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=epiplus>

или запросить у дистрибьютора.

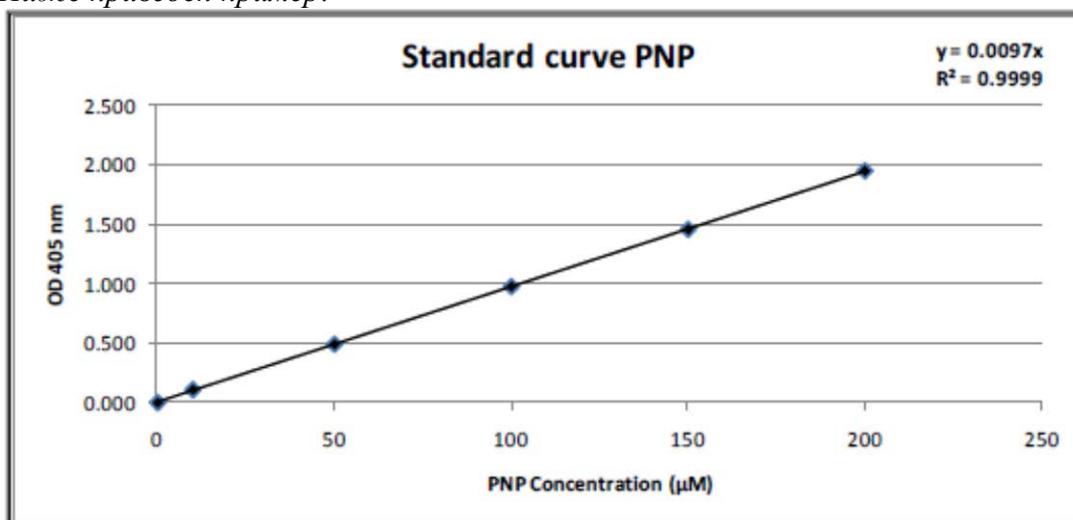
Принцип расчета:

Калибровочная (стандартная) кривая.

1. Вычислите значения Δ ОП (корректированные на пустую пробу значения ОП). Для этого вычтите значение ОП нулевого стандарта (пустой пробы) из всех значений ОП стандартов: $\Delta \text{ ОП} = \text{ОП}_{\text{стандарта}} - \text{ОП}_{\text{нулевой стандарт}}$

2. Отложите на графике значения Δ ОП (по оси Y) против концентрации стандартных растворов (по оси X) и постройте график линейной регрессии для вычисления коэффициента наклона калибровочной кривой. Коэффициент детерминации R^2 должен быть $\geq 0,99$.

Ниже приведен пример:



Вычисление активности фермента в образцах:

1. Вычислите значения Δ ОП для всех реакционных образцов и образцов с ингибитором (отрицательных контролей). Для этого вычтите значение ОП нулевого стандарта (пустой пробы) из всех полученных ОП реакционных образцов и образцов с ингибитором: $\Delta \text{ ОП} = \text{ОП}_{\text{образца}} - \text{ОП}_{\text{нулевой стандарт}}$
2. Рассчитайте скорректированное на фон значение ОП образца спермы (семенной жидкости). Для этого вычтите $\Delta \text{ ОП}_{\text{отрицательного контроля}}$ из $\Delta \text{ ОП}_{\text{реакционного образца}}$
3. Рассчитайте соответствующие значения концентрации PNP. Для этого разделите скорректированное на фон значение $\text{ОП}_{\text{реакционного образца}}$ на коэффициент наклона калибровочной кривой.
4. Активность фермента (мМЕ/мл) вычисляется путем умножения полученного значения концентрации PNP на 0,479 (см. ниже раздел «Коэффициент коррекции»).

Пример расчета

1. Полученные данные анализа:
 $\text{ОП}_{\text{нулевого стандарта}} = 0,045$; $\text{ОП}_{\text{образца}} = 0,845$; $\text{ОП}_{\text{отрицательного контроля (пробы с ингибитором)}} = 0,060$;
коэффициент наклона калибровочной кривой = 0,0097.
2. $\Delta \text{ ОП}_{\text{образца}} = 0,845 - 0,045 = 0,800$
 $\Delta \text{ ОП}_{\text{отрицательного контроля}} = 0,060 - 0,045 = 0,015$
3. скорректированное на фон значение $\text{ОП}_{\text{образца}} = 0,800 - 0,015 = 0,785$
4. Концентрация PNP = $0,785 / 0,0097 = 80,93$ мкМ;
5. Активность фермента = $80,93 \times 0,479 = 38,76$ мМЕ/мл

Для оценки активности фермента во всем эякуляте полученная активность фермента должна быть умножена на объем эякулята.

Примечание: Стандартная кривая включает точки в диапазоне от 0 до 200 мкМ, поскольку концентрация PNP в большинстве образцов спермы находится в этих пределах. Тем не менее, экспериментально подтверждена линейность кривой до 300 мкМ. При желании можно изменить калибровочную кривую до 300 мкМ, что соответствует активности фермента 144 мМЕ/мл. При более высокой активности неизвестного образца рекомендуется его разведение и повторное проведение теста для подтверждения полученных при анализе данных.

Коэффициент коррекции

Данный коэффициент получается, исходя из коэффициента разбавления пробы и времени инкубации (120 мин).

В анализе используются образцы спермы объемом 20 мкл, которые разбавляются до 1150 мкл (20 мкл пробы спермы + 130 мкл реакционного буфера + 1000 мкл останавливающего буфера), что дает коэффициент разбавления 57,5.

Одна единица активности фермента определяется как образование 1 мкМ PNP за минуту. Таким образом, для вычисления активности в минуту коэффициент разбавления нужно разделить на 120. Это дает коэффициент коррекции, равный 0,479.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Данный тест является вспомогательным средством для диагностики и, как и для других биологических тестов, интерпретация результатов должна проводиться в рамках клинических результатов и данных анамнеза. Необходимо исключить другие причины недостаточности эпидидимальной секреции, как, например, андрогенную недостаточность или атрофию яичек в тяжелой форме.

Все материалы необходимо утилизировать безопасным образом в соответствии с местными/национальными нормами.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

FertiPro N.V., Бельгия

www.fertipro.com

ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ:

ООО «Селл Диагностик»

Адрес для почтовых отправлений: 220020 Минск, а/я 5

Тел.: +375 29 391 16 90

Факс: +375 17 395 88 09

E-mail: cell.diagnost@gmail.com

www.celldiagnostic.by



СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jöckenhovel F, and Nieschlag E. (1990) Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int. J. Androl.*, 13: 297-305.
2. Guerin JF, Ben Ali H, Rollet J, Souchier C, and Czyba JC. (1986) AlphaglucoSIDase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J. Androl.*, 7: 156-162
3. Casano R, Orlando C, Caldini AL, Barni T, Natali A, and Serio M. (1987) Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha 1-4-glucosidase and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligospermic patients. *Fertil. Steril.*, 47: 324-328
4. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, and Nieschlag E. (1988) Epididymal markers in human infertility. *J. Androl.*, 9: 91-101
5. Haidl G, Badura B, Hinsch KD, Ghyczy M, Gareiss J, Schill WB. (1993) Disturbances of sperm flagelle due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum. Reprod.*, 7: 1070-1073
6. Paquin R, Chapdelaine P, Dubé JY, Tremblay RR (1984) Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-glucosidase. *J. Androl.*, 5: 227-282
7. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition. Measurement of neutral alpha-glucosidase in seminal plasma. pp. 134-136
8. Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29
9. Shrivastava A, Vipin B, Gupta VB (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2: 21-25
10. Chesher D. (2008) Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem. Rev.*, 29: S23-S
11. Eertmans F, Bogaert V, Van Poecke T, and Puype B. (2014) An Improved Neutral a-Glucosidase Assay for Assessment of Epididymal Function – Validation and Comparison to the WHO Method. *Diagnostics.* 4: 1-11