



Визначення нейтральної α -глюкозидази (25 тестів)

Діагностичний набір in vitro для кількісного визначення змісту альфа-глюкозидази в спермі (сім'яній плазмі) людини.

Документ: FP09 I87 R01 B.4

Оновлено: 29/04/2019

Скорочення

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (Інститут клінічних та лабораторних стандартів)

CV Coefficient of Variation (Коефіцієнт варіації)

IVD (Діагностичний пристрій in vitro)

LOD Limit Of Detection (Межа виявлення)

LOQ Limit Of Quantification (Межа кількісного виявлення)

OD Optical Density (Оптична щільність)

PNP Para (4)-Nitrophenol (Пара (4)-нітрофенол)

PNPG Para (4)-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (Пара (4)-нітрофеніл-альфа-D-глюкопіранозид)

SDS Sodium dodecyl sulfate (Додецилсульфат натрія)

WHO World Health Organization (Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ))

Призначення

EpiScreen Plus являє собою діагностичний набір лабораторного призначення для діагностики in vitro (IVD), який використовується для кількісного визначення рівня альфа-глюкозидази в спермі (сім'яній плазмі) людини. За допомогою одного набору EpiScreen Plus можливо оцінити ферментативну активність не менше ніж 25 проб. Тільки для професійного використання.

Загальна інформація

Активність альфа-глюкозидази в об'ємі сперми, а конкретніше – її нейтрального ізофермента, залежить від секретії епідімісом¹. У пацієнтів з азооспермією і нормальним рівнем андрогенів у периферичній крові активність нейтральної альфа-глюкозидази в семенній плазмі - надійний маркер епідіміального вкладу в еякулят.

У чоловіків з азооспермією та двусторонньою непрохідністю між епідімісом і сім'явиприскувальним протоком активність альфа-глюкозидази в семенній плазмі дуже знижена². Напроти, якщо азооспермія визвана затримкою дозрівання сперматозоїдів або непрохідністю між епідімісом і мережею яєчка, або в самій мережі яєчка, активність альфа-глюкозидази знаходиться в нормі. Таким чином, оцінка рівня нейтральної альфа-глюкозидази в сім'яній плазмі в більшості випадків дозволяє диференціювати причину азооспермії^{3,4}. Низька активність нейтральної альфа-глюкозидази в сім'яній плазмі у пацієнтів з олігозооспермією може відобразити часткову непрохідність епідіміса, пов'язану з інфекційним або запальним захворюванням^{2,5}.

Ферментативна активність у пацієнтів з нормальною концентрацією сперматозоїдів корелює з результатами фарбування по Шору шийки і хвоста сперматозоїда, які відображають зміни у мембрані сперматозоїда, викликані епідіміальною секретією⁵. Аналізи за допомогою EpiScreen Plus можуть допомогти в постановці діагнозу та лікуванні безпліддя у чоловіків.

Принцип аналізу

Принцип тесту засновано на наступній реакції:

PNPG + альфа-глюкозидаза --> альфа-D-глюкопіранозид + PNP (жовтий)

При зазначених умовах (pH = 6,8; T = 37 ° C), 1 МО альфа-глюкозидази звільнює 1 μ моль PNP за одну хвилину з субстрату PNPG⁷. Жовте забарвлення PNP можна реєструвати на спектрофотометрі при 405 нм. Активність альфа-глюкозидази виражається як МО / л (або мМО / мл) . Реакційний буфер містить SDS, який селективно інгібує кислотну форму альфа-глюкозидази, джерелом якої є передміхурова залоза. Це дозволяє виконати специфічне визначення активності нейтрального фермента⁶.

Інгібування: Глюкоза інгібує альфа-глюкозидазу, зв'язуючись з моносахарид-зв'язуючою ділянкою альфа-глюкозидази⁸. Цей процес інгібування являє собою явище, яке залежить від pH та дози, і є принципом, що лежить в основі підготовки контрольних проб сперми (сім'яній плазмі).

Типи зразків

Дослідження можна проводити як на свіжих, так і заморожених/розморожених пробах сперми і сім'яній плазмі.

Матеріали, які входять до складу набору:

- Реагент 1 (5 мл): реакційний буфер (pH 6,8), який містить 1% SDS
 - Реагент 2 (0,25 мл): 50X розчин субстрату (PNPG в ДМСО)
 - Реагент 3 (5 мл): розчин інгібітору (реакційний буфер, який містить глюкозу)
 - Реагент 4 (60 мл): зупиняючий буфер (0,02 M NaOH)
 - Реагент 5 (1 мл): основний розчин стандарту (5 мМ PNP)
 - Реагент 6 (60 мл): буфер для розбавлення стандартів (0,02 M NaOH + 0,1% SDS)
- Сертифікат аналізу і паспорт безпеки (MSDS) надається по запиті або може бути завантажено з веб-сайту (www.fertipro.com).

Матеріали, які не входять до складу набору:

Спектрофотометр для читання планшетів, фотометр (з фільтром на 405 нм), термомішалка або водяна баня, піпеточний дозатор, пробірки Eppendorf на 1,5 мл, мікротитрувальний планшет

Зберігання, транспортування та стабільність

Витримує транспортування чи короточасне зберігання при підвищеній (до 5 дб при 37°C) температурах. Набір EpiScreen Plus™ необхідно зберігати при 2-8°C в захищеному від (сонячного) світла місці, строк зберігання складає 24 місяці (навіть після відкриття). Не використовувати після закінчення терміну придатності.

Характеристики аналізу

Параметри валідації обчислювались згідно останнім вказівкам CLSI^{9,10}

Діапазон вимірювання: 2,32-144 мМЕ/мл

CV в межах одного аналізу: 3,08%

CV для різних аналізів: 10,52%

Чутливість: 96.0 %*

Специфічність: 93,6% *

Відсічення: 6,35 мМЕ/мл;

WHO: Нижня межа нормального діапазону значень для нейтральної альфа-глюкозидози складає 20 мМЕ/еякулят (з корекцією на об'єм еякуляту)

* вазектомінізовані/нормозооспермійні

Перевірка перед використанням

Не використовувати цей набір, якщо порушена герметичність контейнера або виявлені дефекти виготовлення. При зберіганні при температурі 2-8°C в Реагенті 1 можливий випад осадку, який зникає при попередньому прогріванні до 37°C.

Метод

Ми рекомендуємо подивитись наше демонстраційне відео (завантажити його можна за посиланням на нашому веб-сайті або відсканувати штрих-код вказаний нижче).



Примітка 1: Організація WHO (ВООЗ) рекомендує застосовувати для корекції фону тільки дві внутрішні контрольні проби. Оскільки варіації фону в пробах сперми достатньо великі (+/-20%), рекомендовано готувати для кожної проби сперми (сім'яної плазми) негативну контрольну пробу для забезпечення правильних і відтворюваних корекцій фону.

Примітка 2: Коли реагенти або зразки необхідно нагріти або проінкубувати, завжди використовувати водяну баню з терморегулятором або термошейкер з реакційними пробірками чи термоблок. НЕ ІНКУБУВАТИ в повітряному інкубаторі, оскільки це може погіршувати результати аналізів.

Виконайте наступні дії:

1. Розігріти реагенти 1,2 та 3 до 37°C протягом 30хв на теплій водяній бані, термошейкері чи термоблоці
2. Для кожної проби, яка підлягає аналізу :
 - приготувати реакційний розчин : 3 мкл розчину субстрату (реагент 2) в 147 мкл реакційного буфера (реагент 1)
 - приготувати інгібуючий розчин : 3 мкл розчину субстрату (реагент 2) в 147 мкл розчину інгібітора (реагент 3)
3. Відібрати піпеткою по 20 мкл кожної проби сперми (сім'яної плазми) в дві пробірки Eppendorf на 1,5 мл
4. Додати 130 мкл реакційного розчину в один реакційний посуд і 130 мкл інгібуючого розчину – в другий (для негативного контролю)
5. Провести інкубацію на вихровій мішалці протягом 2 годин при 37°C в теплій водяній бані або термоблоці
6. Протягом інкубації проб сперми (сім'яної плазми) приготувати розчини для PNP- стандартної кривої:
 - а. Приготувати стандарт з найвищою концентрацією 200 мкМ , розбавивши 100 мкл основного розчину стандарту (реагент 5) в 2400 мкл буфера для розведення стандарту (реагент 6). Обережно перемішувати.
 - б. Використовувати цей розчин для приготування інших стандартів згідно з таблицею, яка представлена нижче . Сам по собі реагент 6 слугить стандартом для 0 (порожня проба).

Таблиця Розведення стандартів PNP

PNP- стандарт	Стандарт 200 мкМ (мкл)	Реагент 6 (мл)
200мкл	500мкл	0мкл
150мкл	375мкл	125мкл
100мкл	250мкл	250мкл
50мкл	125мкл	375мкл
10мкл	25мкл	475мкл
0мкл(холоста проба)	0мкл	500мкл

7. Через 2 години інкубації проб (реакційних та інгібітора) зупинити реакцію шляхом видалення з термоблоку (термобані), додав 1 мл стоп- буфера (реагент 4), перемішати
8. Відібрати піпеткою по 200 мкл всі проби і стандартів (приготованих на кроці 6) в мікро планшет
9. Виміряти поглинання фотомітри при 405 нм

Підрахунок результатів

Скачайте лист підрахунку результатів в Excel з нашого веб-сайту та включіть данні в лист для розрахунку результатів <http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=epiplus>

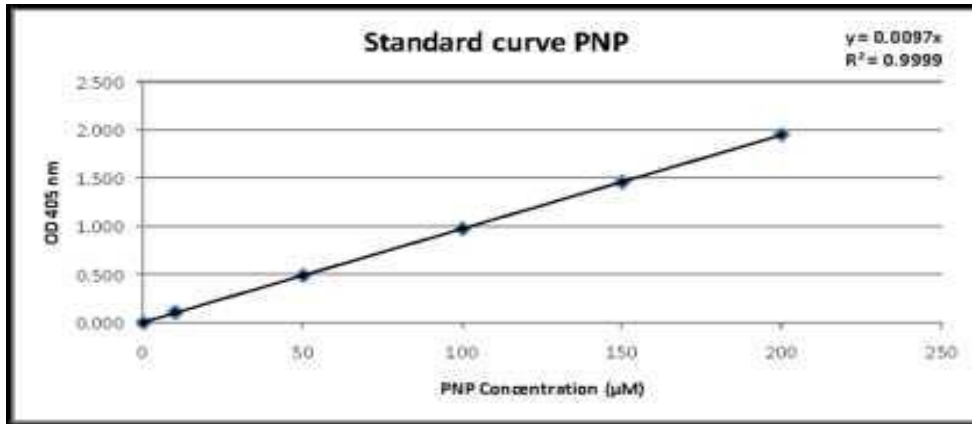
ПРИНЦИП:

1. Обчислити необхідно точно всі виміряні значення оптичної густини (ОГ) (значення ОГ стандарту – значення ОГ холостої проби (0 мкМ PNP-стандарту)). Значення повинні бути точними, тому що вони будуть використані в подальших розрахунках.
2. Зробити розрахунки PNP калібрувальної кривої - з концентрацією стандарту по осі X і скоригованим значенням оптичної густини на осі Y. Потім по лінійній регресії виконати обчислення кута нахилу. Коефіцієнт детермінації (R2) повинен бути ≥ 0.99 .

3. Для кожної реакції зразка: розрахувати значення з урахуванням корекції фону для проб семенної плазми (= точна оптична густина (ОГ) реакції – точна ОГ інгібітора відповідно)
4. Використовувати рівняння кривої регресії для розрахунку концентрації PNP невідомого зразка (Концентрація PNP= фон – точне значення ОГ/схил)
5. Розрахувати активність ферменту (мМЕ/мл) шляхом множення концентрації PNP на 0.479 (див. розділ "поправочний коефіцієнт" нижче). Розраховану активність ферменту помножити на обсяг еякуляту, щоб оцінити активність ферменту у всьому еякуляті.

ПРИКЛАД

Аналіз даних і калібрувальна крива:



Нахил кривої=0,0097(крива рівняння: $y=0,0097x$) $R^2 = 0.9999$
 ОГ порожньої проби (0 мкМ PNP-стандарту) = 0,045;
 ОГ проба = 0,845 → корекція фону; $0,845 - 0,045 = 0,800$
 ОГ інгібітора = 0,060 → корекція фону: $0,060 - 0,045 = 0,015$:
 ОГ проби з корекцією фону = $0,800 - 0,015 = 0,785$
 Концентрація PNP = $0,785 / 0,0097 = 80,93$ мкМ
 Активність ферменту в мл = $80,93 \times 0,479 = 38,76$ мМО / мл
 Активність ферменту в еякуляті = $80,93 \times$ об'єм еякуляту (мл)

Примітка 1: Крива стандартів складається з точок в діапазоні 0-200мкМ, оскільки значення для більшої частини проб сперми потрапляють в цей діапазон. Однак лінійність кривої підтверджена аж до 300 мкМ. При бажанні оператор може змінити криву, почавши з 300 мкМ, що відповідає ферментативної активності в 144мМО / мл.

Примітка 2:Корегуючий фактор 0.479 встановлено виходячи з коефіцієнта розведення проби для часу інкубації (120 хв). В аналізі використовуються проби сперми обсягом 20 мкл, які розбавляються до 1150 мкл (20 мкл проби сперми +130 мкл реакційного буфера +1000 мкл зупиняючого буфера), що дає коефіцієнт розведення 57,5. Одна ферментативна одиниця визначається як утворення 1µмоль PNP за хвилину. Тому для обчислення активності за хвилину коефіцієнт розведення потрібно розділити на 120. Це дає коефіцієнт корекції 0,479.

Попередження та застереження

Цей тест є допоміжним засобом для діагностики і для інших біологічних тестів; інтерпретація результатів повинна здійснюватися в рамках клінічних результатів і даних анамнезу. Необхідно виключити інші причини недостатності епідидимальної секреції, як, наприклад, гіпоандрогенія або важка тестикулярна атрофія.

Всі матеріали необхідно утилізувати безпечним чином згідно з місцевими / національними нормативами.

Усі органічні матеріали людини повинні розглядатися, як потенційно інфіковані.

Тому потрібно поводитися з усіма зразками так, як із тими, що можуть переносити ВІЛ та гепатит. Не працювати зі зразками без захисного одягу (рукавички, лабораторний халат, окуляри).

Бібліографія

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) Alpha-glucosidase 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, 10th 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

ТЕХНІЧНА ПІДТРИМКА



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Belgium



EPI_PLUS

Уповноважений представник в Україні
Фізична Особа Підприємець Валах Наталія Миколаївна
Україна, 65049, м. Одеса, вул.Жаботинського,6
Тел. (048) 795-67-45, (068) 254-52-66