

EpiScreen Plus™

ASSAY FÜR DIE NEUTRALE ALPHA-GLUKOSIDASE (25 TESTS) – IN-VITRO-DIAGNOSEGERÄT FÜR DIE QUANTITATIVE MESSUNG DER NEUTRALEN ALPHA-GLUKOSIDASE IN HUMANEM SPERMA (SEMINALPLASMA)

Dokument-ID: FP09 I87 R01 B.4 Aktualisierung: 29.04.2019

ABKÜRZUNGEN

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
VK	Variationskoeffizient
IVD	In-vitro-Diagnosekit
NG	Nachweisgrenze
QG	Quantifizierungsgrenze
OD	Optische Dichte
PNP	Para(4)-Nitrophenol
PNPG	Para(4)-Nitrophenyl-alpha-D-Glucopyranosid
NLS	Natriumlaurylsulfat
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

VORGESEHENE VERWENDUNG

EpiScreen Plus™ ist ein In-vitro-Diagnosekit (IVD) für die quantitative Messung der neutralen alpha-Glukosidase in humanem Sperma (Seminalplasma). Mit einem Kit EpiScreen Plus™ kann die enzymatische Aktivität von mindestens 25 Proben beurteilt werden.
Nur für den professionellen Gebrauch.

ALLGEMEINE INFORMATIONEN

Die Menge der alpha-Glukosidase-Aktivität im Sperma, genauer die Menge ihres neutralen Isoenzym, hängt von der Sekretion aus den Nebenhoden ab¹. Bei Patienten mit Azoospermie und einem normalen Androgenspiegel im peripheren Blut ist die Aktivität der neutralen alpha-Glukosidase im Seminalplasma ein zuverlässiger Marker für den Beitrag der Nebenhoden zum Ejakulat.

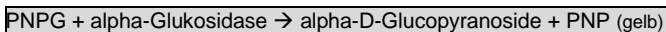
Männer mit Azoospermie mit einer bilateralen Obstruktion zwischen den Nebenhoden und dem Ductus ejaculatorius weisen in ihrem Seminalplasma eine sehr geringe alpha-Glukosidase-Aktivität auf². Wird die Azoospermie jedoch durch einen Abbruch der Spermareifung oder eine Obstruktion zwischen Nebenhoden und Hodennetz bzw. im Hodennetz selbst hervorgerufen, ist die alpha-Glukosidase-Aktivität normal. Aus diesem Grund kann die Beurteilung der neutralen alpha-Glukosidase im Seminalplasma normal maskulinisierter Männer mit Azoospermie zwischen den wichtigsten Ursachen für dieses Phänomen unterscheiden^{3,4}.

Eine geringe Aktivität der neutralen alpha-Glukosidase im Seminalplasma von Patienten mit Oligozoospermie kann auf eine partielle Obstruktion der Nebenhoden im Zusammenhang mit Infektionen oder entzündlichen Erkrankungen hinweisen^{2,5}. Die enzymatische Aktivität bei Patienten mit normaler Spermienkonzentration steht in Zusammenhang mit dem Ergebnis der Shorr-Färbung von Mittelstück und Schwanz und weist auf Veränderungen in der Spermienmembran durch Nebenhodensekretion hin⁶.

Der Test EpiScreen Plus™ kann bei der Beurteilung der Diagnose und der Behandlung der männlichen Unfruchtbarkeit helfen.

TESTPRINZIP

Das Testprinzip basiert auf der folgenden Reaktion:



Unter bestimmten Bedingungen (pH-Wert = 6,8; T = 37 °C) setzt 1 IE alpha-Glukosidase aus Substrat-PNPG 1 µmol PNP pro Minute frei⁷. Die gelbe Farbe von PNP kann spektralphotometrisch bei 405 nm gemessen werden. Die alpha-Glukosidase-Aktivität wird in IE/l (oder mIE/ml) angegeben.

Der Reaktionspuffer enthält NLS, das die saure Form der alpha-Glukosidase aus der Prostata selektiv hemmt. Dies ermöglicht eine spezifische Bestimmung der neutralen Enzymaktivität⁸.

Hemmung: Glucose hemmt die alpha-Glukosidase, indem sie sich an die Monosaccharidbindungsstelle der alpha-Glukosidase bindet⁸. Dieser Hemmvorgang ist ein pH- und dosisabhängiges Phänomen und das Prinzip hinter der Herstellung von Kontrollproben von Sperma (Seminalplasma).

PROBENTYPEN

Das Assay kann an frischen oder gefrorenen/aufgetauten Sperma- und Seminalplasma-Proben durchgeführt werden.

IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

- Reagenz 1 (5 ml): Reaktionspuffer (pH-Wert 6,8) mit 1 % SDS
- Reagenz 2 (0,25 ml): 50 x Substratlösung (PNPG in DMSO)

- Reagenz 3 (5 ml): Hemmlösung (Reaktionspuffer mit Glucose)
- Reagenz 4 (60 ml): Stoppuffer (0,02 M NaOH)
- Reagenz 5 (1 ml): Standard-Stammlösung (5 mM PNP)
- Reagenz 6 (60 ml): Standard-Verdünnungspuffer (0,02 M NaOH + 0,1 % NLS)

Analysezertifikat und Material Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich oder können von der Website (www.fertipro.com) heruntergeladen werden.

NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Plattenleser, Photometer (Filter 405 nm), Thermoshaker oder warmes Wasserbad, Pipettierhilfe, 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen, Mikrotiterplatte

LAGERUNG, TRANSPORT UND STABILITÄT

Geeignet für Transport oder kurzfristige Lagerung bei erhöhten (bis zu 5 Tage bei 37 °C) Temperaturen. EpiScreen Plus™ muss bei 2 – 8 °C vor (Sonnen-) Licht geschützt gelagert werden und bleibt 24 Monate lang stabil (auch geöffnet). Nicht nach dem Ablaufdatum verwenden.

DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS

Die Validierungsparameter wurden anhand der CLSI-Richtlinien berechnet^{9,10}.

Messbereich: 2,32 – 144 mIE/ml

Intra-Assay-Variationskoeffizienten:
3,08 %

Empfindlichkeit: 96,0 %*

Spezifität: 93,6 %*

Inter-Assay-Variationskoeffizienten:
10,52 %

Untergrenze: 6,35 mIE/ml;

Unteres Referenzlimit der WHO: 20 mIE/Ejakulat (berichtigt auf das das Ejakulatvolumen)

* nach Vasektomie/normozoospermisch

ÜBERPRÜFUNGEN VOR DER VERWENDUNG

Das Produkt nicht verwenden, wenn der Verschluss des Behälters bei der Lieferung des Produkts geöffnet oder beschädigt ist. Bei einer Lagerung zwischen 2 und 8 °C kann sich in Reagenz 1 ein Bodensatz bilden, der jedoch bei Vorwärmen auf 37 °C verschwindet.

METHODE

Wir empfehlen, das Demonstrationsvideo anzusehen (kann über den Link auf unserer Website oder durch Scannen des Barcodes heruntergeladen werden):



Anmerkung 1: Die WHO empfiehlt, nur zwei interne Qualitätskontrollproben für die Blindwertkorrektur anzuwenden. Da die Hintergrundvarianz von Spermaproben verhältnismäßig groß ist (+/- 20 %), empfehlen wir die Vorbereitung einer negativen Kontrolle für jede Sperma-/Seminalplasma-Probe, um eine korrekte und wiederholbare Hintergrundkorrektur vornehmen zu können.

Anmerkung 2: Müssen Reagenze oder Proben angewärmt oder inkubiert werden, muss stets ein wärmerereguliertes warmes Wasserbad oder ein für die Reaktionsröhrchen passender Thermoshaker oder Wärmeblock verwendet werden. NICHT in einem Luftinkubator inkubieren, da das Testergebnis so beeinträchtigt werden kann.

Folgende Schritte sind durchzuführen:

1. Reagenz 1, 2 und 3 auf 37 °C anwärmen (30 Minuten im warmen Wasserbad, Thermoshaker oder Wärmeblock).
2. Für jede Sperma-/Seminalplasma-Probe, die analysiert werden soll:
 - Reaktionslösung herstellen: 3 µl Substratlösung (Reagenz 2) in 147 µl Reaktionspuffer (Reagenz 1).
 - Hemmlösung herstellen: 3 µl Substratlösung (Reagenz 2) in 147 µl Hemmlösung (Reagenz 3).
3. 20 µl jeder Sperma-/Seminalplasma-Probe in zwei 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen pipettieren.
4. 130 µl Reaktionslösung in ein Reaktionsröhrchen und 130 µl Hemmlösung in das andere Reaktionsröhrchen hinzufügen (für die Negativkontrolle).
5. Mit dem Vortexmischer schütteln und genau 2 h lang bei 37 °C in einem warmen Wasserbad oder einem Wärmeblock inkubieren.
6. Während der Inkubation der Sperma-/Seminalplasma-Proben werden die Verdünnungen für die PNP-Standardkurve hergestellt:

- Herstellung des höchsten Standards von 200 µM: 100 µl der Standard-Lagerlösung (Reagenz 5) in 2 400 µl des Standard-Verdünnungspuffers (Reagenz 6) lösen. Vorsichtig mischen.
- Ausgehend von dieser Lösung werden die anderen Standards vorbereitet wie in der Tabelle unten angegeben. Reagenz 6 alleine dient als Standard „0“ (blind).

Standardverdünnungen von PNP

PNP-Standards	Standard 200 µM	Reagenz 6
200 µM	500 µl	0 µl
150 µM	375 µl	125 µl
100 µM	250 µl	250 µl
50 µM	125 µl	375 µl
10 µM	25 µl	475 µl
0 µM (= blind)	0 µl	500 µl

- Nach der 2-stündigen Inkubation der Proben (Reaktion und Hemmer) wird die Reaktion durch Entfernen der Röhrchen aus dem warmen Wasserbad oder Wärmeblock, Hinzufügen von 1 ml des Stoppuffers (Reagenz 4) und Schütteln angehalten.
- 200 µl aller (in Schritt 6 hergestellten) Proben und Standards in eine Mikrotiterplatte pipettieren.
- Absorption im Photometer bei 405 nm ablesen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Excel-Berechnungstabelle von der Website herunterladen und die Daten in die Tabelle eingeben, um die Ergebnisse zu berechnen:

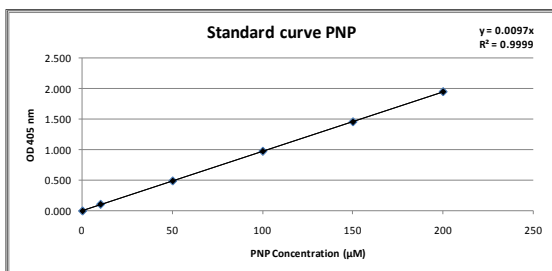
<http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=epiplus>

PRINZIP:

- Alle gemessenen OD-Werte mit dem OD-Blindwert (0 µM PNP-Standard) korrigieren. Nur diese korrigierten Werte werden in den folgenden Berechnungen weiterverwendet.
- Berechnung der PNP-Standardkurve mit den Standardkonzentrationen auf der x-Achse und den korrigierten OD-Werten auf der y-Achse. Dann wird die lineare Regression durchgeführt, um die Neigung zu berechnen. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sollte $\geq 0,99$ sein.
- Für jede Reaktionsprobe: Für den Seminalplasmahintergrund korrigieren (= Korrigierter OD-Wert_{REAKTION} - Korrigierter entsprechender OD-Wert_{HEMMER})
- Die Berechnung der PNP-Konzentration der unbekannt Probe erfolgt anhand der Gleichung der Regressionskurve (PNP-Konzentration = Hintergrund-korrigierter OD-Wert/Neigung)
- Die Enzymaktivität (in mIE/ml) wird durch Multiplikation der PNP-Konzentration mit 0,479 (siehe Abschnitt „Korrekturfaktor“ unten) berechnet
Die berechnete Enzymaktivität kann mit dem Ejakulationsvolumen multipliziert werden, um die Enzymaktivität im gesamten Ejakulat zu bewerten.

Beispiel

Assaydaten und Standardkurve:



Neigung der Kurve = 0,0097 (Gleichungskurve: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

OD-Blindwert (0 µM PNP-Standard) = 0,045;

OD-Wert_{REAKTION} = 0,845 → für Blindwert korrigiert: $0,845 - 0,045 = 0,800$

OD-Wert_{HEMMER} = 0,060 → für Blindwert korrigiert: $0,060 - 0,045 = 0,015$

OD-Wert_{HINTERGRUND-KORRIGIERTE PROBE} = $0,800 - 0,015 = 0,785$

PNP-Konzentration = $0,785 / 0,0097 = 80,93 \mu\text{M}$

Enzymaktivität pro ml = $80,93 \mu\text{M} \times 0,479 = 38,76 \text{ mIE/ml}$

Enzymaktivität pro Ejakulat = $38,76 \text{ mIE/ml} \times \text{Ejakulatvolumen (ml)}$

Anmerkung 1: Die Standardkurve besteht aus Punkten zwischen 0 und 200 µM, da die meisten Spermaproben Werte in diesem Bereich aufweisen werden. Die Linearität der Kurve zeigte jedoch bis zu 300 µM an. Nach Wunsch kann die Bedienperson die Kurve so anpassen, dass sie bei 300 µM beginnt, was einer Enzymaktivität von 144 mIE/ml entspricht.

Anmerkung 2: Der Korrekturfaktor von 0,479 wurde basierend auf dem Probenverdünnungsfaktor und der Inkubationszeit (120 min) festgelegt:

Das Assay verwendet 20 µl der Spermaprobe, die mit den Reagenzien auf 1150 µl verdünnt werden, was einem Verdünnungsfaktor von 57,5 entspricht. Eine Enzymeinheit ist als Bildung von 1 µmol PNP pro Minute festgelegt. Aus diesem Grund wird der Verdünnungsfaktor durch 120 dividiert, um die Aktivität pro Minute zu berechnen. Dies führt zu einem Faktor von 0,479.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieser Test hilft bei der Diagnostizierung und bei anderen biologischen Tests; die Interpretation der Ergebnisse muss innerhalb des Rahmens klinischer Befunde und der Anamnesedaten erfolgen. Andere Ursachen für eine unzureichende Nebenhodensekretion wie Hypoandrogenismus oder eine schwere Hodenatrophie müssen ausgeschlossen werden.

Alle Materialien müssen entsprechend den lokalen/nationalen Normen sicher verarbeitet werden.

Alle humanen organischen Substanzen sollten als potenziell infektiös betrachtet werden. Alle Proben sind daher so zu behandeln, als könnten sie HIV oder Hepatitis übertragen. Beim Umgang mit Proben und Reagenzienstoffen ist stets Schutzkleidung (Handschuhe, Laborkittel, Augen-/Gesichtsschutz) zu tragen.

BIBLIOGRAPHIE

- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jöckenhovel F und Nieschlag E. (1990) Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-Glukosidase in seminal plasma. *Int. J. Androl.*, 13: 297 – 305
- Guerin J.F., Ben Ali H., Rollet J., Souchier C. und Czyba J.C. (1986) Alpha-Glukosidase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J. Androl.*, 7: 156 – 162
- Casano R., Orlando C., Caldini A.L., Barni T., Natali A. und Serio M. (1987) Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha 1-4-Glukosidase and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligospermic patients. *Fertil. Steril.*, 47: 324 – 328
- Cooper T.G., Yeung C.H., Nashan D. und Nieschlag E. (1988) Epididymal markers in human infertility. *J. Androl.*, 9: 91 – 101
- Haidl G., Badura B., Hinsch K.D., Ghyczy M., Gareiss J., Schill W.B. (1993) Disturbances of sperm flagelle due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum. Reprod.*, 7: 1 070 – 1 073
- Paquin R., Chapdelaine P., Dubé J.Y., Tremblay R.R. (1984) Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-Glukosidase. *J. Androl.*, 5: 227 – 282
- Laborhandbuch der WHO zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates – 10. Ausgabe. Bestimmung der neutralen alpha-Glukosidase im Seminalplasma. S. 124 – 126
- Yao X., Mauldin R., Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α -Glukosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22 – 29
- Shrivastava A., Vipin B., Gupta V.B. (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2: 21 – 25
- Chesher D. (2008) Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem. Rev.*, 29: S23-S
- Eertmans F., Bogaert V., Van Poecke T. und Puype B. (2014) An Improved Neutral α -Glukosidase Assay for Assessment of Epididymal Function - Validation and Comparison to the WHO Method. *Diagnostics*. 4: 1 – 11

TECHNISCHER SUPPORT



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Belgien



EPI_PLUS