

# EPISCREEN PLUS™

TEST ALPHA-GLUCOSIDASE NEUTRE (TROUSSE DE 25 TESTS) –  
DIAGNOSTIC IN VITRO POUR LA MESURE QUANTITATIVE DE L'ALPHA-  
GLUCOSIDASE NEUTRE DANS LE SPERME HUMAIN OU LE PLASMA  
SÉMINAL.

Référence document : FP09 I87 R01 B.4 Mise à jour : 29/04/2019

## ABRÉVIATIONS

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Coefficient de variation
DIV	Diagnostic <i>in vitro</i>
LdD	Limite de détection
LdQ	Limite de quantification
DO	Densité optique
PNP	Para-(4)-nitrophénol
PNPG	Para-(4)-nitrophényle-alpha-D-glucopyranoside
SDS	Sodium dodecyl sulphate
OMS	Organisation mondiale de la Santé

## UTILISATION PRÉVUE

EpiScreen Plus™ est un diagnostic *in vitro* (DIV) pour la mesure quantitative de l'alpha-glucosidase neutre dans le sperme humain ou le plasma séminal. L'activité enzymatique de 25 spécimens peut être évaluée avec un kit EpiScreen Plus™.

Réactif réservé à un usage professionnel.

## INFORMATIONS GÉNÉRALES

L'activité de l'alpha-glucosidase dans le sperme, et plus particulièrement de celle de son isoenzyme neutre, dépend en grande partie de sa sécrétion par l'épididyme<sup>1</sup>. Chez les patients présentant une azoospermie et un taux normal d'androgènes dans le sang périphérique, l'activité de l'isoforme neutre de l'alpha-glucosidase dans le plasma séminal est un marqueur fiable de la contribution de l'épididyme à l'éjaculat.

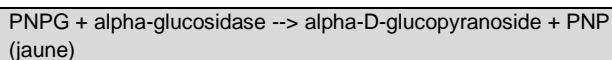
Chez les hommes atteints d'azoospermie ayant une obstruction bilatérale entre l'épididyme et le canal éjaculateur, l'activité de l'alpha-glucosidase du plasma séminal est très faible<sup>2</sup>. En revanche, si l'azoospermie est due à un arrêt de la maturation des spermatozoïdes ou à une obstruction située entre l'épididyme et le rete testis ou dans le rete testis lui-même, l'activité de l'alpha-glucosidase est normale. Par conséquent, l'évaluation de l'isoenzyme neutre de l'alpha-glucosidase dans le plasma séminal d'hommes atteints d'azoospermie ayant une virilité normale permet de distinguer les causes principales de cette pathologie<sup>3,4</sup>.

Une faible activité de l'isoenzyme neutre de l'alpha-glucosidase dans le plasma séminal de patients souffrant d'oligozoospermie peut être le résultat d'une obstruction partielle des épидидymes liée à une infection ou à une maladie inflammatoire<sup>2,5</sup>. L'activité enzymatique chez les patients présentant une concentration normale de spermatozoïdes est corrélée au résultat de la coloration de Shorr de la pièce intermédiaire et du flagelle, qui reflète des modifications de la membrane des spermatozoïdes induites par la sécrétion épидидymaire<sup>5</sup>.

Le test EpiScreen Plus™ peut contribuer au diagnostic et à la prise en charge de la stérilité masculine.

## PRINCIPE DU TEST

Le principe du test est basé sur la réaction suivante :



Dans des conditions spécifiées (pH = 6,8 ; t = 37 °C), 1 UI d'alpha-glucosidase libérera 1 µmol de PNP par minute à partir du substrat PNP<sup>7</sup>. La couleur jaune du PNP peut être mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. L'activité de l'alpha-glucosidase est exprimée en UI/l (ou mUI/ml).

Le tampon de réaction contient du SDS, qui inhibe de façon sélective la forme acide de l'alpha-glucosidase d'origine prostatique. Ceci permet de déterminer spécifiquement l'activité de l'isoenzyme neutre<sup>6</sup>.

**Inhibition** : Le glucose inhibe l'alpha-glucosidase en se fixant sur le site de liaison aux monosaccharides de l'enzyme<sup>8</sup>. Ce processus d'inhibition est un phénomène dépendant du pH et de la dose qui sert de base à la création d'échantillons témoins de sperme (plasma séminal).

## TYPES D'ÉCHANTILLONS

Le test peut être effectué sur des échantillons de sperme et de plasma séminal frais ou congelés/décongelés.

## MATÉRIEL INCLUS DANS LE KIT

- Réactif 1 (5 ml) : tampon de réaction (pH 6,8) additionné de 1 % de SDS
- Réactif 2 (0,25 ml) : solution de substrat 50 x (PNPG dans du DMSO)
- Réactif 3 (5 ml) : solution inhibitrice (tampon de réaction contenant du glucose)
- Réactif 4 (60 ml) : tampon d'arrêt (NaOH 0,02 M)
- Réactif 5 (1 ml) : solution mère étalon (PNP 5 mM)
- Réactif 6 (60 ml) : tampon de dilution étalon (NaOH 0,02 M + SDS 0,1 %)

Un certificat d'analyse et une FDS sont disponibles sur demande ou au téléchargement sur notre site internet ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

## MATÉRIEL NON INCLUS DANS LE KIT

Lecteur de plaque, photomètre (filtre 405 nm), agitateur-incubateur ou bain d'eau chaude, pipeteur, tubes Eppendorf de 1,5 ml, plaque de micro-titrage.

## CONSERVATION ET STABILITÉ

Possibilité de transport ou de conservation de courte durée à des températures élevées (jusqu'à 5 jours à 37 °C). EpiScreen Plus™ doit être conservé à 2-8 °C, à l'abri de la lumière (du soleil), et reste stable pendant 24 mois (même si les bouteilles ont été ouvertes). Ne pas utiliser après la date de péremption.

## PERFORMANCES DU TEST

Les paramètres de validation ont été calculés sur la base des dernières directives CLSI<sup>9,10</sup>.

Plage de mesure : 2,32-144 mUI/ml	
CV intra-essais : 3,08%	Sensibilité : 96,0 %*
CV inter-essais : 10,52%	Spécificité : 93,6% *
Valeur seuil : 6,35 mUI/ml ;	
La limite de référence inférieure (WHO) : 20 mUI/éjaculat (si corrigé pour le volume d'éjaculat)	

\* vasectomie/normozoospermie

## VERIFICATIONS PREALABLES A L'UTILISATION

Ne pas utiliser le produit si le scellé du contenant est rompu ou défectueux à la livraison du produit. Un précipité peut se former dans le Réactif 1 en cas de conservation à 2-8 °C ; il disparaît par préchauffage à 37 °C.

## MODE D'UTILISATION

Nous vous conseillons de regarder notre vidéo de démonstration. Télécharger la vidéo sur notre site, ou scanner le code barre:



*Remarque 1 : L'OMS recommande de n'utiliser que deux échantillons de contrôle interne de la qualité pour la correction à blanc. Étant donné que la variation du bruit de fond des échantillons de sperme est très importante (+/- 20 %), nous recommandons de préparer un témoin négatif pour chaque échantillon de sperme (plasma séminal) afin de permettre une correction appropriée et reproductible du bruit de fond.*

*Remarque 2 : Pour un réchauffement optimal des échantillons, nous recommandons l'utilisation d'un bain d'eau chaude thermorégulé ou d'un agitateur-incubateur pour tube de réaction ou un bloc chauffant. NE PAS incuber dans un incubateur à air, sous peine de fausser les résultats du test.*

Suivre les étapes suivantes :

1. Avant emploi, réchauffer les réactifs 1, 2 et 3 pour les amener à 37 °C pendant 30 min (dans un bain d'eau chaude, agitateur-incubateur, bloc chauffant).
2. Pour chaque échantillon de sperme (plasma séminal) à analyser :
  - préparer la solution de réaction : 3 µl de solution de substrat (réactif 2) dans 147 µl de tampon de réaction (réactif 1)
  - préparer la solution inhibitrice: 3 µl de solution de substrat (réactif 2) dans 147 µl de solution inhibitrice (réactif 3)
3. Pipeter 20 µl de chaque échantillon de sperme (plasma séminal) dans deux tubes Eppendorf de 1,5 ml.
4. Ajouter 130 µl de solution de réaction dans un réacteur et 130 µl de solution inhibitrice dans l'autre. (pour le témoin négatif)
5. Agiter au vortex et incuber pendant exactement 2 h à 37 °C dans un bain d'eau chaude ou un bloc chauffant.

6. Pendant l'incubation des échantillons de sperme (plasma sérial), préparer les dilutions pour la courbe de référence du PNP comme suit :
- Préparer l'étalon le plus élevé (200 µM) en dissolvant 100 µl de solution mère étalon (réactif 5) dans 2400 µl de tampon de dilution étalon (réactif 6).
  - Utiliser cette solution pour préparer les autres étalons, comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Le réactif 6 employé seul sert d'étalon 0 (blanc).

Dilutions standard de PNP

Courbe de référence du PNP	Étalon 200 µM	Réactif 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 (= blanc)	0 µl	500 µl

- Après 2 h d'incubation des échantillons (échantillons témoins négatifs d'inhibiteur et échantillons de réaction), arrêter la réaction en retirant les tubes du bloc chauffant/bain chaud et en ajoutant 1 ml de tampon d'arrêt (réactif 4) et agiter au vortex.
- Pipeter 200 µl de tous les échantillons et étalons (préparés lors de l'étape 6) sur une plaque de micro-titrage.
- Lire l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un photomètre.

## INTERPRETATION

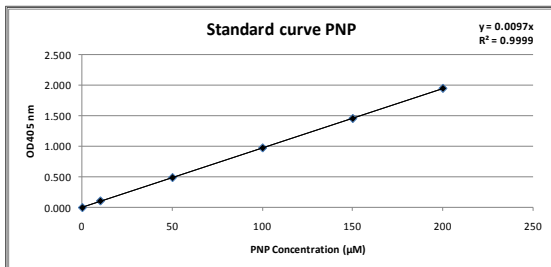
Télécharger la feuille de calcul Excel sur notre site et entrer les données dans la feuille pour calculer les résultats :

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

## PRINCIPE

- Corriger toutes les valeurs de OD mesurées pour la valeur de OD à blanc (courbe de référence du PNP 0 µM). Ces valeurs corrigées serviront seulement dans les calculs suivants.
- Calculer la courbe de référence du PNP en utilisant les concentrations standard dans l'axe X et les valeurs de OD corrigées dans l'axe Y. La régression linéaire est faite pour calculer la pente, le coefficient de détermination ( $R^2$ ) devrait être  $\geq 0,99$ .
- Corriger l'arrière-plan du plasma sérial pour chaque échantillon de réaction (= réaction OD corrigée - inhibiteur OD correspondant corrigé).
- Utiliser l'équation de la courbe de régression pour calculer la concentration de PNP de l'échantillon inconnu. (concentration du PNP = le bruit de fond - valeur de OD corrigé/ la pente)
- L'activité enzymatique (mUI/ml) est obtenue en multipliant la valeur de PNP par 0,479 (voir rubrique « Facteur de correction » ci-après). L'activité enzymatique calculée peut être multipliée par le volume de l'éjaculat afin d'évaluer l'activité enzymatique dans l'ensemble de l'éjaculat.

Exemple : courbe standard et données de test :



Pente de la courbe de référence = 0,0097 (courbe de l'équation :  $y = 0,0097x$ ),  $R^2 = 0,9999$

OD à blanc (courbe de référence du PNP 0 µM) = 0,045 ;

OD réaction, corriger pour le blanc = 0,845 - 0,045 = 0,800

OD d'inhibiteur (témoin négatif), corriger pour le blanc = 0,06 - 0,045 = 0,015

OD corrigée pour le bruit de fond de l'échantillon = 0,800 - 0,015 = 0,785

Concentration de la PNP =  $0,785/0,0097 = 80,93 \mu\text{M}$

Activité enzymatique par ml =  $80,93 \times 0,479 = 38,76 \text{ mUI/ml}$

Activité enzymatique par éjaculat =  $38,76 \text{ mUI/ml} \times \text{le volume de l'éjaculat (ml)}$

**Remarque 1 :** La courbe de référence est constituée de points allant de 0 à 200 µM, étant donné que la valeur de la plupart des échantillons de sperme sera comprise dans cette plage. La linéarité de la courbe a cependant été démontrée jusqu'à 300 µM. En cas de besoin, l'opérateur peut modifier la courbe en commençant à 300 µM, ce qui correspond à une activité enzymatique de 144 mUI/ml.

**Remarque 2 :** Le facteur de correction de 0.479 est obtenu en prenant en compte le facteur de dilution et le temps d'incubation (120 min) de l'échantillon :

Pour ce test, un échantillon de sperme de 20 µl est dilué pour obtenir un volume de 1150 µl, soit un facteur de dilution de 57,5.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité de 0.1 µmol PNP formée par minute. Le facteur de dilution doit par conséquent être divisé par 120 pour calculer l'activité par minute. On obtient ainsi un facteur de dilution de 0,479.

## MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Ce test constitue un auxiliaire diagnostique mais, comme pour tout test biologique, les résultats doivent être interprétés dans le cadre de l'examen clinique et des données de l'anamnèse. Les autres causes d'une sécrétion épидидymaire insuffisante, telles qu'une hypoandrogénie ou une atrophie testiculaire importante, doivent être écartées. Tous les matériaux doivent être utilisés de manière sûre selon les normes locales/nationales.

Tout matériel organique humain doit être considéré comme potentiellement infectieux. Manipuler tous les échantillons comme s'ils pouvaient transmettre le VIH ou l'hépatite. Toujours porter des vêtements de protection pour manipuler les échantillons et les réactifs (gants, blouse, protection yeux/visage).

## BIBLIOGRAPHIE

- 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
- 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
- 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
- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, and Nieschlag E. (1988) Epididymal markers in human infertility. *J. Androl.*, 9: 91-101
- 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
- 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
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 10<sup>th</sup> edition. Measurement of neutral alpha-glucosidase in seminal plasma. pp. 134-136
- Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in alpha-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29
- 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
- Chesher D. (2008) Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem. Rev.*, 29: S23-S
- Eertmans F, Bogaert V, Van Poecke T, and Puype B. (2014) An Improved Neutral alpha-Glucosidase Assay for Assessment of Epididymal Function - Validation and Comparison to the WHO Method. *Diagnostics.* 4: 1-11

## ASSISTANCE TECHNIQUE



FertiPro NV  
Industriepark Noord 32  
8730 Beernem  
Belgique



EPI\_PLUS