ANTIGENES GMBH
Labordiagnostika
Römerstraße 20-22
D-58332 Schwelm
Tel.: +49 2336 9154958
Fax: +49 2336 9154957
Email: info@antigenes.de
Homepage: www.antigenes.de

Gebrauchsinformation

Produktname: SemenGlu

REF ZR105000 88

IVD

SemenGlu

(Semen Neutral-α-Glucosidase Test)

CE

Anwendung

Seminalplasma enthält diverse metabolische Markersubstanzen, die für Sexualorgane spezifisch sind. Es befinden sich im Seminalplasma sowohl ein neutrales α-Glukosidase-Isoenzym, welches aus dem Nebenhoden stammt, als auch das saure Isoenzym, das in der Prostata gebildet wird. Dem neutralen α-Glukosidase-Enzym wird die höchste Spezifizität und Sensitivität für den Nebenhoden beigemessen.

Prinzip der Methode

Glukosidase wandelt synthetisches Glukopyranosid-Substrat zu p-Nitrophenol (pNP) um, welches bei Zugabe von Natriumcarbonat eine Gelbfärbung annimmt.
Um die Sensitivität der Messmethode zu steigern, wird Castanospermin als Inhibitor eingesetzt. Es hilf dabei, unspezifische Reaktionen der Probe zu erkennen. Die beschriebene Methode ist für Spektralphotometer konzipiert worden, die eine Sensitivität von 1,9 mU/ml aufweisen. Trotzdem kann nach wie vor ein normales Photometer verwendet werden. In diesem Fall müssen die Volumina des Seminalplasmas und der Reagenzien proportional angepasst werden.

PNPG + α-Glucosidase → α-D-Glucopyranoside + pNP (gelb)

Lagerung

2–8 C

Ungeöffnet 12 Monate ab Herstellungsdatum haltbar.

Inhalt

- Reagenz 1 (pNP) 2 ml
- Reagenz 2 (PBS-SDS) 5 ml
- Reagenz 3 (Inhibitor) 100 µl
- Reagenz 4 (PNPG) 10 ml
- Reagenz 5 (Natriumbikarbonat) 50 ml
- 1 Mikrotiterplatte

Benötigte Utensilien und Materialien

- Aqua dest.
- Handschuhe
- Papiertücher
- Microplate Reader
- Pipetten und Spitzen (10–100 und 100–1000 µl)
- Reagenzgefäße (1,5 oder 2 ml)
- Reagenzgefäßhalter
- Seminalplasma (50 µl)
- Tischzentrifuge
- Vortex-Mischer oder ähnlicher Mischer
- Wasserbad oder Ähnliches 37 °C

Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien 2, 4, 5 und 6 im Wasserbad auf 37 °C erwärmen.

p-Nitrophenol-Standardkurve erstellen:

	Reagenz 1 (µl)	Reagenz 2 (µl)	Endkonzentration pNP (µMol)
V_0	0	500	0
V_1	25	475	1,25
V_2	125	375	6,25
V_3	250	250	12,5
V_4	375	125	18,75
V_5	500	0	25

Es ist zu empfehlen, an jedem neuen Versuchstag die Standardkurve neu zu erstellen.

Durchführung

1. Ejakulat 10 min bei 1000g zentrifugieren.
2. Überstand (Seminalplasma) vorsichtig in ein neues Reagenzgefäß überführen.
3. 15 µl des Seminalplasmas in ein Reagenzgefäß geben.
4. Standardlösungen laut Tabelle p-Nitrophenol-Standardkurve ansetzen (Reagenz 1 und 2).
5. Für den Inhibitoransatz 8 µl Reagenz 3 in ein weiteres Reagenzgefäß pipettieren.
6. 100 µl der auf 37 C vorgewärmten Reagenz 4 zu jedem Reagenzgefäß (Standard, Inhibitor und Probe) pipettieren.
7. Alle Lösungen gut mischen (Vortex) und für 2h bei 37 C inkubieren. Temperatur und Dauer der Inkubation sind entscheidend für die Messergebnisse und exakt einzuhalten.
8. Reaktion durch die Zugabe von 1 ml Reagenz 5 stoppen und erneut mischen.
9. Alle Reagenzgefäße 1 min bei 1000g zentrifugieren.
10. Je 250 µl der Proben und des Standards (in Doppelbestimmung) in die Wells der Mikrotiterplatte nach folgendem Schema pipettieren:

	1	2	3	4	5	...	12
A	V_0	V_0	P_1	P_1			
B	V_1	V_1	P_2	P_2			
C	V_2	V_2	P_3	P_3			
D	V_3	V_3	P_4	P_4			
E	V_4	V_4					
F	V_5	V_5					
G	G_I	G_I					
H							

Standard-Verdünnungsreihe: A1 und A2 bis F1 und F2
Glukosidaseinhibitor G_I: G1 und G2
Proben B3 und B4 bis E3 und E4 etc.

ANTIGENES GMBH
Labordiagnostika
Römerstraße 20-22
D-58332 Schwelm
Tel.: +49 2336 9154958
Fax: +49 2336 9154957
Email: info@antigenes.de
Homepage: www.antigenes.de

Gebrauchsinformation

Produktname: SemenGlu

11. Die OD (Optische Dichte, Extinktion) kann innerhalb von 60 min bei 405 nm Wellenlänge im Microplate-Reader abgelesen werden.

Ergebnis: Tabelle OD-Werte

	1	2	3	4	5	…	12
A	0,077	0,077	0.329	0,320			
B	0,116	0,119	0,131	0,132			
C	0,272	0,282	0,107	0,108			
D	0,479	0,479	0,109	0,109			
E	0,643	0,649					
F	0,833	0,814					
G	0,086	0,102					
H							

Auswertungsziel: Bestimmung der n-α-Glukosidaseaktivität im Gesamtejakulat

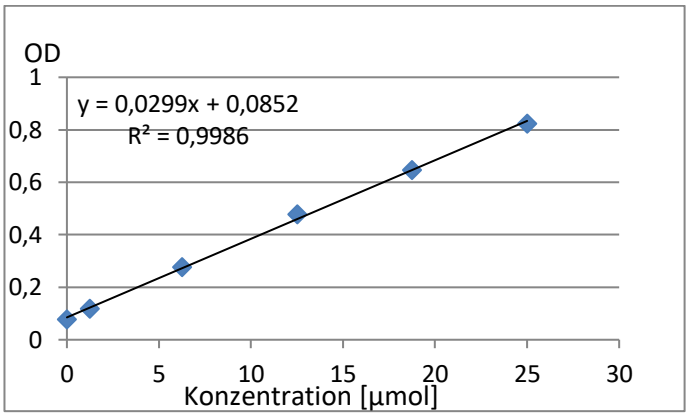
Der untere Referenzbereich für die neutrale α-Glukosidase liegt bei ≥ 20 mU pro Ejakulat.

Die Interpretation der Ergebnisse muss unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und der Patientenanamnese erfolgen. Andere Gründe für eine niedrige epididymale Sekretion wie ein Hypoandrogenismus oder eine schwere testikuläre Atrophie sind ebenfalls abzuklären.

Eine sehr geringe α-Glukosidase-Aktivität (< 13,5 U/l) tritt bei Patienten mit Azoospermie als Folge eines doppelseitigen Verschlusses zwischen den Nebenhoden und den Samenleitern auf. Die diagnostische Bedeutung liegt hauptsächlich in der Abgrenzung der Verschluss-Azoospermie von der Nicht-Verschluss-Azoospermie, wobei bei dem ersteren deutlich niedrigere Werte gemessen werden. Normale N-α-Glukosidasewerte im Seminalplasma (> 20 U/l) treten bei einer Hemmung in der Spermiogenese, bei einer Obstruktion des Hodennetzes oder eine Obstruktion zwischen Hodennetz und Nebenhoden auf.

I. Erstellung der pNP-Standardkurve:

Die pNP-Standardkurve wird mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (z.B. Microsoft Excel®) erstellt. Auf der x-Achse werden die pNP-Konzentrationen (µMol), auf der y-Achse die OD-Werte aufgetragen.
Dies ermöglicht auch die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes (R^2), welches zur Bestimmung der Arbeitsgenauigkeit (1 bis 99% bzw. 0,01 bis 0,99) bei der Erstellung der Standardkurve dient; sollte der Wert niedriger als 0,99 liegen, so muss die Standardkurve erneut angefertigt werden.



*Optische Dichten (OD) von Proben, die nicht im Bereich der Standardkurve liegen, können nicht für eine Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Diese sind dann mit angepassten Probenmengen zu wiederholen.

II. Konzentrationsberechnung x in der Probe
Die Konzentration der Probe kann nun abgelesen oder mittels der Steigungsfunktion ausgerechnet werden. Die allgemeine Formel der Standardkurve und der Probe lautet:

$$y = ax + c \rightarrow x\ (\mu Mol) = (y - c) / a$$

y = Extinktionswert der Probe
x = Konzentration der eingesetzten Probe (µMol)
a = Steigungsfunktion; c = Linearkonstante der Kurve

III. Umrechnung der Konzentration in Aktivität
Die Einheit IU (*international unit*) für α-Glukosidase ist definiert als die α-Glukosidaseaktivitat, die 1 µMol pNP bei 37 °C pro Minute umsetzt. Der Korrekturfaktor ist nötig, da bei diesem Assay 15 µl Seminalplasma in einem **Gesamtvolumen von 1.115 µl (15 µl + 100 µl + 1000 µl)** über einen Zeitraum von 120 Minuten eingesetzt werden.

Der Korrekturfaktor (Standard und Probe) errechnet sich folgendermaßen: (1115/15) / 120 = 0,6194.
Dieser wird mit den Ergebnissen multipliziert, um der Aktivität der neutralen α-Glukosidase in unverdünnten Proben zu ermitteln.

Der Korrekturfaktor des Inhibitor-Ansatzes errechnet sich folgendermaßen: (1108/8) / 120 = 1,1541.
Die Ergebnisse des Inhibitor-Ansatzes (IU/l) wird von den Messwerten abgezogen, um die unspezifischen Reaktionen rechnerisch zu eliminieren.

ANTIGENES GMBH
Labordiagnostika
Römerstraße 20-22
D-58332 Schwelm
Tel.: +49 2336 9154958
Fax: +49 2336 9154957
Email: info@antigenes.de
Homepage: www.antigenes.de

Gebrauchsinformation

Produktname: SemenGlu

IV. Berechnung von Glukosidaseaktivität im Gesamtejakulat. Die Berechnung erfolgt in folgenden Schritten:

1. Berechnung der Konzentration x der eingesetzten Probe, abgeleitet aus der allg. Formel des Extinktionswertes:

x (µMol) = (y- c) / a

2. Berechnung der Glukosidaseaktivität in unverdünnter Probe

x • Korrekturfaktor

3. Berechnung der pNP-Konzentration im Inhibitor-Ansatz

$x_{GI} = (y_{GI} – c) / a$

4. Aktivitätsberechnung des Inhibitor-Ansatzes

x_{GI} • Korrekturfaktor $_{GI}$

5. Berechnung der tatsächlichen Glukosidaseaktivität in unverdünnten Proben.

(x • Korrekturfaktor) – (x_{GI} • Korrekturfaktor $_{GI}$)

6. Berechnung der Glukosidaseaktivität pro Ejakulat

[(x • Korrekturfaktor) – (x_{GI} • Korrekturfaktor $_{G1}$)] • V = mU

Beispielrechnung

Mit vier Proben: Seminalplasma (P_1, 5 ml), Humanserum (P_2, 20 ml), Hühnerserum (P_3, 50 ml), Humanurin (P_4, 200 ml)

U_n = Glukosidaseaktivität der Probe
U_{Pn} = tatsächliche Glukosidaseaktivität der Probe
U_{Vn} = Glukosidaseaktivität (mU) / Ejakulat
V = Probenvolumen

Mittelwert der OD berechnen (aus Punkt 9 der Durchführung)

	Standard OD	Proben OD	
V_0	0,077		
V_1	0,1175	0,3245	P_1
V_2	0,277	0,1315	P_2
V_3	0,479	0,1075	P_3
V_4	0,646	0,109	P_4
V_5	0,8235		
G_I	0,094		

1. pNP-Konzentration in Proben und Inhibitor
P_1 = (0,3245 - 0,0852) / 0,0299 / µMol= 8,0033 µMol
P_2 = 1,5484 µMol P_3 = 0,7458 µMol P_4 = 0,7959 µMol

2. Berechnung der Glukosidaseaktivität der unverdünnten Proben:
$U_1 = P_1$ • Korrekturfaktor = 8,0033 µMol• 0,6194 = 4,9475 U/l

$U_2 = P_2$ • Korrekturfaktor = 1,5484 µMol • 0,6194 = 0,9590 U/l

U_3 = 0,4619 U/l U_4 = 0,4929 U/l

3. Berechnung der pNP-Konzentration im Inhibitor-Ansatz

G_I = (0,094 – 0,0852) / 0,0299 / µMol = 0,2943 µMol

4. Aktivitätsberechnung des Inhibitor-Ansatzes
$U_i = G_I$ • Korrekturfaktor$_{GI}$ = 0,2943 µMol• 1,1541 = 0,3396 U/l

5. Berechnung der tatsächlichen Glukosidaseaktivität (U_{Pn}) in den unverdünnten Proben:

$U_{P1} = U_1 – U_I$ = 4,9475 U/l– 0,3396 = 4,6079 U/l
$U_{P2} = U_2 – U_I$ = 0,9590 U/l - 0,3396 = 0,6194 U/l
U_{P3} = 0,1223 U/l U_{P4} = 0,1533 U/l

6. Glukosidaseaktivität pro Ejakulat
$U_{V1} = U_{P1}$ • V = 4,6079 U/l • 0,005 l = 0,023039 U/l oder 23,04 mU
U_{V2} = 0,6194 U/l • 0,020 l= 0,012388 U = 12,39 mU
U_{V3} = 0,006115 U = 6,115 mU
U_{V4} = 0,03066 U = 30,66 mU

Beispiel 1: OD über höchstem Standardwert

	alt	neu
Volumen Probe	15 µl	7,5 µl
Volumen AB	100 µl	107,5 µl

Nach dem Messen ist das Ergebnis mit dem Korrekturfaktor **0,7433** zu multiplizieren

Beispiel 2: OD unter geringstem Standardwert

	alt	neu
Volumen Probe	15 µl	30 µl
Volumen AB	100 µl	85 µl

Nach dem Messen ist das Ergebnis mit Korrekturfaktor **0,3097** zu multiplizieren.

Sicherheitshinweise/ Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Samenproben sollten als potenziell infektiös betrachtet werden.
- Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie HIV oder Hepatitis übertragen könnten.
- Tragen Sie immer Sicherheitskleidung, wenn Sie mit Proben und Reagenzien arbeiten (Handschuhe, Kittel, Augen-/Gesichtsschutz).
- Die Reagenzien 1, 2 und 4 enthalten SDS (Sodium Dodecyl Sulphate). Pulverförmig ist es leicht entzündlich, gesundheitsschädlich bei Kontakt mit der Haut und beim Verschlucken. Es reizt die Augen, Atemwege und die Haut. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser ausspülen und den Arzt konsultieren.
- Reagenz 1 enthält p-Nitrophenol. Es ist giftig beim Einatmen, Verschlucken und Kontakt mit der Haut. Es können Reizungen der Augen, der Verdauungswege, zu Blutvergiftung, Leberschaden, Schwindel, Übelkeit, Kopfschmerz und Atemwegsreizung auftreten. Möglicherweise wirkt es krebserregend und sensibilisierend. Es hat giftige Wirkung auf das Nervensystem von Lebewesen. Bei Berührung mit der Haut muss die betroffene Stelle sofort mit viel Wasser abgewaschen werden.
- Reagenz 3 enthält Castanospermine. Es ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken, Hautkontakt und Einatmen.
- Reagenz 4 enthält P-Nitrophenol-Glukopyranosid (PNPG). Es ist gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Kontakt mit der Haut, reizt Augen und Atemwege und verursacht irreversiblen Schäden.

ANTIGENES GMBH
Labordiagnostika
Römerstraße 20-22
D-58332 Schwelm
Tel.: +49 2336 9154958
Fax: +49 2336 9154957
Email: info@antigenes.de
Homepage: www.antigenes.de

Produktname: SemenGlu

- Reagenz 5 enthält Natriumbikarbonat. Als Natriumsalz der schwachen Kohlensäure reagiert es mit stärkeren Säuren unter Bildung von Kohlenstoffdioxid (Aufschäumen). In Wasser löst Natriumcarbonat sich unter Wärmeentwicklung (Hydratationswärme). Eine stark alkalische Lösung entsteht, da das Carbonat Anion als Base mit einem Proton aus dem Dissoziationsgleichgewicht des Lösungsmittels Wasser zum Hydrogencarbonation (HCO_3^-) reagiert und eine entsprechend hohe Hydroxidionen Konzentration entsteht.

Referenzen

Casano R *et al*. (1987) Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha 1-4-glucosidase and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligospermic patients. *Fertil Steri*l, 47: 324

Cooper TG *et al.* (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 of Androl*, 13: 297–305

Cooper TG *et al.* (1988). Epididymal markers in human *infertility J Androl*, 9: 91.

Eertmans F *et al.* (2014) An Improved Neutral a-Glucosidase Assay for Assessment of Epididymal Function - Validation and Comparison to the WHO Method. Diagnostics. 4: 1-11

Fourie MH *et al.* (1998) Comparative study on the EpiScreen kit and a conventional method for the determination of seminal α-glucosidase activity, *Andrologia*, 30(3):133–139.

Guerin JF *et al*. (1986). Alpha-glucosidase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J Androl,* 7: 156.

Haidl G *et al.* (1993) Disturbances of sperm flagelle due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum Rep,* 7: 1070–1073.

Haidl G *et al.* (2011) Ejakulatdiagnostk in: *Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane.* Thieme Verlag; 124-150

Paquin R *et al.* (1984) Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha- 1,4-glucosidase. *J. Androl.*, 5: 227-282.

Shrivastava A *et al.* (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2: 21-25

Yao X *et al.* (2003) Multiple sugar binding sites in α- glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta,* 1645: 22-29.

WHO Press, (2010) Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition