

Інструкція по застосуванню Діагностичного сперм-гіалуронового тесту HBA® для аналізу сперми in vitro. (HBA®Sperm-Hyaluronan Binding Assay) www.hba-ivd.com

Патентована і встановлена назви: HBA®Sperm-Hyaluronan Binding Assay

Виробник: Біокоат, Инк., 211 Вітмер Роад, Хоршам, Пенсільванія, Сполучені Штати Америки (Biocoat, Inc., 211 Witmer Rd., Horsham, PA 19044, США)

Призначення

Діагностичний сперм-гіалуроновий тест HBA ® для аналізу сперми in vitro є компонентом наступних досліджень:

1. стандартний аналіз сперми в рамках діагностики чоловічого безпліддя;
2. оцінка адекватності проведення ЕКЗ (екстракорпорального запліднення) в рамках лікування безпліддя.

Зведена інформація

При природному заплідненні зрілий спермій зв'язується з гіалуронатом (Г) - основним компонентом матриксу cumulus oophorus, зв'язування незрілих спермій з Г не відбувається. Зрілі спермії також зв'язуються з гіалуронатом, хімічно прикріпленою до штучної підкладки; прикладом такої підкладки є покрите гіалуронатом на предметному склі, що входить в комплект HBA®. Пов'язані спермії можна відрізнити від незв'язаних при мікроскопії: пов'язаний спермій відрізняє биття джгутика, проте його головка не робить поступальних рухів. Зв'язування з гіалуронатом вказує на успішне завершення сперматогенезу, опосередкованого білком-шапероном HspA2. У відсутності шаперона можуть відбуватися репарація ДНК, зв'язування з гіалуронатом, дефіцит мейозу і інші етапи сперматогенезу. Спермії, нездатні до зв'язування з гіалуронатом, мають наступні риси незрілості: зберігають цитоплазму і гістони, виявляють високу частоту аберантної морфології, мають нижчу геномну цілісність, ніж спермії, зв'язані Г. Спермії, зв'язані Г, мають значно менше число одноланцюгових розривів ДНК, ніж незв'язані, а також в 4-6 разів меншу частоту хромосомних анеуплоїдій. Після зв'язування з Г відбувається стимуляція рухливості спермій. Таким чином, здатність зв'язуватися з Г вказує на зрілість спермія, відносний вміст зрілих спермій визначає зрілість зразка сперми.

Предметне скло HBA®

Предметне скло HBA® містить дві ідентичні камери для аналізу, вкриті гіалуронатом. Відносний вміст (відсоток), що пов'язуються з Г спермій визначається шляхом підрахунку числа рухомих пов'язаних і непов'язаних сперматозоїдів в одній області.

Збір та підготовка зразка.

Сперма забирається шляхом мастурбації, через 2-3 дні після сексуального утримання, і поміщається в чистий сухий контейнер. Перед розведенням сперму необхідно протягом 30 хвилин витримати при температурі 20-28°C. Зразки, що зберігають в'язкість після 30 хвилин, можна розвести в рівному обсязі спеціальним середовищем для розведення сперми (розчині, що імітує середовище всередині фаллопієвих труб жінки). Аналіз зразка сперми потрібно виконати протягом 3 годин після забору.

Попередження і заходи безпеки

1. Сперма є біологічно небезпечною рідиною. При роботі зі спермою, а також при її утилізації необхідно дотримуватися стандартних запобіжних заходів щодо біологічно небезпечних/потенційно інфікованих матеріалів. Використовуйте рукавички, захисні

окуляри і лабораторний халат. Всі відходи вимагають дезінфекції та утилізації в контейнер для біологічно небезпечних матеріалів.

2. Предметне скло діагностичного сперм-гіалуронового тесту НВА® не призначене для селекції спермій для процедур ICSI або ЕКЗ! Предметне скло нестерильне, воно містить ендотоксини і може мати ембріотоксичну дію. Використання цього комплекту не допускає проведення селекції спермій на предметному склі діагностичного сперм-гіалуронового тесту НВА®.

Зберігання

Діагностичний сперм-гіалуроновий тест НВА® для аналізу сперми in vitro потрібно зберігати в чистому сухому середовищі при температурі 20-28°C.

Виконання аналізу

Надані матеріали	Не надані матеріали
• Предметне скло НВА® • Покривні стекла • Інструкція по застосуванню продукту	• Мікроскоп з 400-кратним збільшенням • Одноразові стерильні тестові пробірки з кришками • Механічний рахунковий пристрій • Розчин, що імітує середовище всередині фаллопієвих труб жінки, розчин для розведення сперми з вмістом білка > 0,50 мг/мл • Одноразові рукавички для роботи із зразками • Таймер / годинник • Піпетка, що забирає 2-10 мкл рідини, одноразові наконечники для піпеток • Візирне перехрестя для мікроскопа

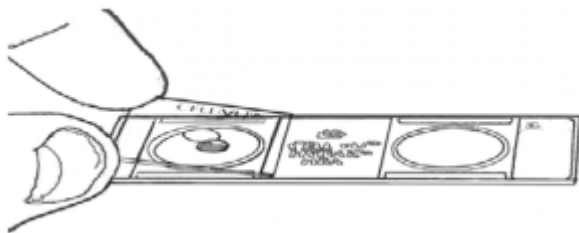
Покрокова процедура

1. Виконуйте аналіз при температурі 20-30 ° C.
2. Завантажте сперму в камеру для аналізу. Безпосередньо перед використанням змішайте зразок і додайте його краплю (7-10 мкл) в центр камери для аналізу.
3. Відразу ж після додавання краплі встановіть покривне скло. Не допускайте утворення бульбашок повітря під покривним склом.

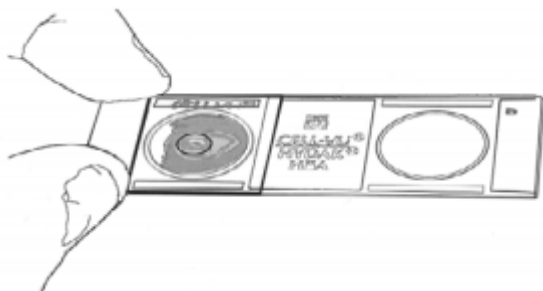
Покривне скло має сітку, що складається з 100 квадратів розміром 0,1 x 0,1 мм, що знаходяться всередині кола огляду. При установці покривного скла окружність для огляду повинна бути вгорі. Щоб не допустити утворення бульбашок повітря, прикладіть один край покривного скла до краю камери, сформувавши кут, що нагадує дверну петлю (див. мал. 1).

Повільно опустіть протилежний край покривного скла, закриваючи «Дверну петлю». Коли покривне скло наблизиться до предметного скла, покривне скло торкнеться краплі зразка (див. мал. 2). продовжуйте опускати покривне скло, не відпускаючи його з пальців. Відпустіть покривне скло, коли окружність повністю покриється зразком (див. мал. 3). потім посуňte покривне скло так, щоб коло опинилася в центрі камери.

Малюнок 1: Прикладіть покривне скло до предметного скла:



Малюнок 2: Прикладіть покривне скло до зразка:



Малюнок 3: Покривне скло на місці:



4. Виконуйте інкубацію камери протягом не менш 10 хвилин, але не більше 20 хвилин. Підрахуйте число рухомих незв'язаних спермій і рухливих пов'язаних спермій в одному і тому ж числі квадратів сітки (областей). Протягом 10 хвилин все спермії увійдуть в контакт з нерухомим шаром Г і зв'яжуться з ним. Після 20 хвилин слабо рухомі спермії можуть почати втрачати рухливість. Пов'язані рухливі спермії не виявлять поступального руху, але як і раніше збережуть активне биття джгутика. Мертві і нерухомі спермії не виявлять руху джгутика. Незв'язані Г рухливі спермії будуть перебувати у вільному русі. Точність аналізу досягається в тому разі, якщо сумарне число пов'язаних і незв'язаних рухливих спермій знаходиться в межах 100-200. Порахуйте рухливі спермії переважного класу (пов'язані чи непов'язані) доти, доки не долічите до 100 спермій або 100 квадратів сітки. Після цього відразу ж підрахуйте рухливі спермії іншого класу в тому ж числі квадратів сітки. Не завжди вдається виявити 100 рухомих спермій в зразку (особливо при олігоспермії).
5. Підрахуйте процент спермій, що пов'язуються Г. Підрахунок відсотка спермій, що зв'язуються з шаром Г, виконується наступним чином.

$$\% \text{ зв'язаних} = 100 \times \frac{\text{Зв'язані рухливі спермії}}{\text{Зв'язані рухливі спермії} + \text{Незв'язані рухливі спермії}}$$

Приклад

У 100 квадратах сітки виявлено 89 незв'язаних рухливих спермій. Відразу ж після цього в 100 квадратах сітки виявлено 27 рухомих пов'язаних спермій.

$$23\% \text{ зв'язаних} = 100 \times \frac{27 \text{ Зв'язані рухливі спермії}}{27 \text{ Зв'язані рухливі спермії} + 89 \text{ Незв'язані рухливі спермії}}$$

Точність аналізу

Точність аналізу пов'язана з числом підрахованих спермій. Чим більше спермій підраховано, тим нижче похибка результату. Мінімальна рекомендована кількість рухливих спермій становить 100. Проте результати є допустимими, якщо виявлено всього 30 рухомих спермій. У дослідженні діапазону результатів серед стекол з трьох різних партій одні і ті ж зразки аналізувалися на різних предметних стеклах.

У нормальному зразку підраховано приблизно 196 спермій в кожному аналізі.

Результати : (в середньому (% пов'язаних) / коефіцієнти варіації,% / число аналізів): (86,9, 85,5, 85,0 / 4, 5, 4/20, 10, 10).

У патологічному зразку (олігоспермія) нараховано приблизно 41 спермій в кожному аналізі.

Результати: (59,0, 55,8, 58,4 / 18, 34, 17/20, 10, 10).

Контроль якості

Для демонстрації реакції зв'язування спермій з Г можна використовувати свіжу зрілу сперму. Однак свіжих контрольних зразків сперми немає у продажу. Користувачам рекомендується самостійно шукати джерела свіжих контрольних зразків сперми для встановлення нормальних і патологічних показників діагностичного сперм-гіалуринового тесту НВА®. Перебіг реакції зв'язування спермій з Г не змінюється після заморозки або розморожування спермій. Крім того, на нормальне зв'язування спермій з Г не впливає обробка за методом флотації або центрифугування в градієнті щільності.

Очікувані результати

Відсоток спермій, пов'язаних з Г, може становити від 0 до 100%. У дослідженні 157 зразків сперми, узятих у пацієнтів з передбачуваним діагнозом безпліддя, в більшій частині зразків виявлено середній показник діагностичного сперм-гіалуринового тесту НВА®, що становить $93 \pm 2,6\%$ зв'язувань. У меншій частині показник діагностичного сперм-гіалуринового тесту НВА® різнився від 0 до 88% зв'язувань (середнє значення - $70 \pm 18\%$). Приблизно в 1% зразків не було виявлено зв'язування з Г. Підготовка сперми (за методом флотації або центрифугування в градієнті щільності) може змінити відсоток зв'язаних Г спермій в зразку.

Обмеження / неполадки в роботі

Можна використовувати тільки свіжу сперму, отриману не більше 3 годин назад. У зразку потрібно виявити щонайменше 30 рухливих сперматозоїдів. Якщо нараховано менше 30 спермій, встановіть на мікроскоп візирне перехрестя і перевірте одне за одним інші поля зору, щоб покрити достатню область для виявлення 30 рухомих спермій (як пов'язаних, так і непов'язаних). Також можна виконати концентрування зразка і повторний його аналіз. Завжди перевіряйте те, що зразок нанесено на частину предметного скла, покриту Г. Якщо частина, покрита Г, спрямована вгору, чітко видно напис «CELL-VU». При нанесенні спермій і покривного скла на непокриту частину предметного скла складеться враження, що спермії не зв'язуються. Якщо покривне скло придавити занадто сильно, спермії можуть здатися нерухомими.

Якщо зв'язування не спостерігається, повторіть аналіз цього ж зразка на іншому предметному склі, щоб підтвердити результати

У рідкісних випадках можливий дефект покривного скла, коли сітка розташована зверху покривного скла, а не на стороні, що контактує зі зразком. Якщо такий дефект виявлений, повторіть аналіз з новим покривним склом. Зв'яжіться з постачальником для заміни дефектних стекол. Якщо бульбашка повітря не дозволяє підрахувати спермії в сітці, повторіть аналіз в новій камері, використовуючи нове покривне скло.

Достовірність результатів

Низький показник діагностичного сперм-гіалуронового тесту НВА® відображає низький відсоток зрілих спермій, що є одним з факторів безпліддя. Спермії, що зв'язуються з Г, здатні до взаємодії з ооцитами і виявляють високу геномну цілісність, а такі спермії надають більш якісний матеріал для формування зиготи. Здатність до зв'язування з Г асоціюється з такими характеристиками спермія, як низька або висока функціональна цілісність, а також потенціал фертильності.

З точки зору прогнозування фертильності необов'язково, щоб всі спермії були здатні зв'язуватися з Г, для високої ймовірності запліднення потрібно, щоб був лише достатній відсоток таких спермій. Зв'язувальна здатність, яка перевищує необхідний рівень, ймовірно, не підвищує шанси запліднення. Діагностичний сперм-гіалуроновий тест НВА® диференціює зразки сперми по фертильності на основі кореляцій з морфологією нормальних спермій. Приблизний показник НВА®, що свідчить про фертильності, становить 80%. Див таблицю 1.

Таблиця 1

НВА® - Інтерпретація результатів аналізу	
Показник НВА®(% Зв'язування)	Інтерпретація
> 80% зв'язування	Нормальні зрілість і фізіологічна функція
<80% зв'язування	Недостатні зрілість і фізіологічна функція

Перевірка достовірності методу

Проведено дослідження, в якому порівнювались результати діагностичного сперм-гіалуронового тесту НВА® з морфологічними показниками нормальних спермій (жорсткі критерії). У дослідженні використовувалися зразки з трьох лабораторій ЕКЗ або андрологічних лабораторій з трьох штатів - Коннектикут (СТ), Каліфорнія (СА) і Пенсільванія (РА). Зразки забиралися у пацієнтів з передбачуваним діагнозом безпліддя. В кожному центрі отримано мінімум 50 зразків. Діагностичний сперм-гіалуроновий тест НВА® виконувався відповідно до інструкції по застосуванню. Морфологічні мікропрепарати готувалися на місці і відправлялись в центральну установу, де виконувалася їх оцінка одним експертом. Дані аналізувалися методом двовимірної таблиці статистичної структури досліджуваної вибірки з використанням морфологічних характеристик (зразок класифікувався як безплідний при наявності менше <5% морфологічно нормальних спермій, в зворотному випадку зразок вважався фертильним), а також показника НВА® (зразок класифікувався як безплідний, якщо показник зв'язування становив менше <80%, в зворотному випадку зразок вважався фертильним). Достовірність перевірена за критерієм хі-квадрат (критерій узгодженості Пірсона) з використанням програмного забезпечення SPSS для ОС Windows. Аналіз показав, що показник діагностичного сперм-гіалуронового тесту НВА® значимо корелює з морфологією для зведених даних, отриманих з усіх трьох центрів, см. таблицю 2. Зведені дані виявили хорошу специфічність і позитивну прогностичну силу, однак чутливість складала всього 40%. Так, при відсіканні зразків зі зв'язуванням <80% аналіз НВА® виявляє менше половини зразків з істинною патоморфологією, серед зразків, які виявили низький показник НВА®, існує висока ймовірність (> 80%), патоморфології.

Таблиця 2

Достовірність зв'язку між показником НВА® і морфологією					
Центр	N	Чутливість	Специфічність	Позитивна прогностична сила	p =
РА	50	43,2	76,9	84,2	0.198 (NS)
РА-р◇	50	51,3	90,9	95,2	0.012
СА	52	54,2	78,6	68,4	0.015
СТ	55	26,5	100	100	0,01
Зведені дані	157	40,0	85,5	80,9	0.001

◇ Дані центру перераховані з відсічками <5% для морфології і <80% для НВА

Мова наведення інформації – державна, українська.

Маркування містить назву виробу та наступну мінімально обов'язкову інформацію до нанесення (згідно до ДСТУ EN 980:2007 та ISO 15223-1:2016)

Символ	Позначення	Приклад
—	Назва виробу	xxxxxx
	"Виробник"	Biocoat, Inc., 211 Witmer Road, Horsham, PA 19044, USA (США)
	уповноважений представник	ПП «МЕДІТА»02091, м. Київ, вулиця Тростянецька, будинок 6-Б, кв.81
	"Дата виготовлення"	20xx.xx.xx
	Не використовувати при пошкодженій упаковці	
	"Повторно використовувати заборонено"	
	"Використати до"	20xx.xx.xx
 партія	"Код партії"	123456
	"Ознайомлення з інструкціями до застосування"	
	Температурне обмеження	20-30 ⁰ С
	Засторога! Ознайомитися із супровідними документами Увага, дивись інструкцію з використання	
 099	Знак відповідності технічним регламентам	

Дата останнього перегляду інструкції 1.12.2017.