

EPISCREEN PLUS™

Диагностичен комплект за определяне на неутралната алфа-глюкозидазна активност в човешка сперма и семенна плазма

Идентификационен номер на документа: FP09 I87 R01 C.1

Актуализация: 22 декември 2022 г.

Само за инвитро диагностична употреба.

Реактив само за професионална употреба.

ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

EpiScreen Plus™ може да помогне при диагностицирането и лечението на мъжкото безплодие. Този тест може да се използва за определяне на неутралната алфа-глюкозидазна активност в спермата (плазмата) – ензим, който се отделя главно от епидидима¹.

Активността на този ензим е надежден маркер за функцията на епидидимиса при пациенти с (много) ниска концентрация на сперматозоиди или пациенти с азооспермия, които имат нормално ниво на андроген в кръвта:

- много ниската активност показва двустранна обструкция между епидидимиса и еякулационния канал².
- ниската активност може да отразява частична обструкция на епидидимиса².
- нормална ензимна активност се очаква, когато е налице обструкция над зоната, в която се секретира ензимът, или в случаи на необструктивна азооспермия (тестикуларна дисфункция)^{2,3}.

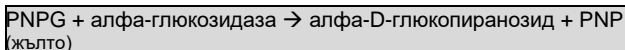
ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

EpiScreen Plus™ е полуколичествен, неавтоматизиран, фотометричен и диагностичен комплект за откриване на неутрална алфа-глюкозидаза в човешка сперма или семенна плазма, който може да бъде полезен за диагностициране и лечение на мъжко безплодие.

Един комплект EpiScreen Plus™ е предназначен за 25 теста.

ПРИНЦИП НА ТЕСТА

Принципът на теста се основава на следната реакция:



При определени условия (рН = 6,8; Т = 37°C) 1 IU алфа-глюкозидаза освобождава 1 μmol PNP за минута от субстрата PNPG⁵. Жълтият цвят на PNP може да се измери спектрофотометрично при 405 nm. Алфа-глюкозидазната активност се изразява в IU/l (или mIU/ml).

Забележка: Реакционният буфер съдържа SDS, който селективно инхибира киселата форма на алфа-глюкозидазата, произхождаща от простатата. Това позволява специфично определяне на активността на неутралния ензим⁴.

Забележка: Тъй като фоновата дисперсия на пробите от сперма е доста голяма (+/-20 %), препоръчваме да се подготви отрицателна контрола за всяка проба от сперма (плазма), като се използва инхибиращият разтвор. Този инхибиращ разтвор съдържа глюкоза, която инхибира алфаглюкозидазната активност⁶.

МАТЕРИАЛИ, ВКЛЮЧЕНИ В КОМПЛЕКТА

- Реактив 1 (5 ml): реакционен буфер (рН 6,8), допълнен с 1 % SDS
- Реактив 2 (0,25 ml): 50x субстратен разтвор (PNPG в DMSO)
- Реактив 3 (5 ml): инхибиращ разтвор (реакционен буфер, съдържащ глюкоза)
- Реактив 4 (60 ml): стопиращ буфер (0,02 M NaOH)
- Реактив 5 (1 ml): основен разтвор на стандарта (5 mM PNP)
- Реактив 6 (60 ml): буфер за разреждане на стандарта (0,02 M NaOH + 0,1 % SDS)

Сертификат за анализ и MSDS се предоставят при поискване или могат да бъдат изтеглени от нашия уебсайт (www.fertipro.com).

НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СЕ ПРЕДОСТАВЯТ

Четец на плаки, фотометър (405 nm филтър), термален шейкър, топлинен блок или топла водна баня, пипета с нови накрайници, 1,5 ml епруветки Eppendorf, микротитърна плака

МЕТОД

Сканирайте баркода (или последвайте връзката от www.fertipro.com), за да видите демонстрационния видеоклип.



ПРОБА

Трябва да се използват стандартни контейнери за събиране на сперма, когато спермата се събира чрез мастурбация. Те обикновено са правят от полипропилен и се тества оцеляването/подвижността на сперматозоидите. Когато не е възможно събирането на сперма чрез мастурбация, трябва да се използват презервативи от синтетичен материал, които не са токсични за спермата. Центрофугируйте семенната проба, напр. при 3000 g за 10–15 минути, за да получите семенна плазма без сперматозоиди.

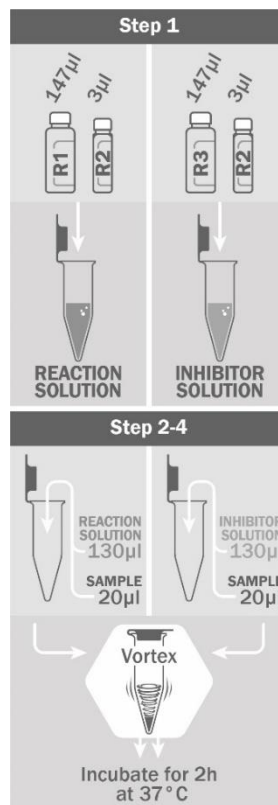
Анализът може да се извършва върху пресни или замразени/размразени проби от сперма и семенна плазма.

ПОДГОТОВКА НА РЕАКТИВА

Не използвайте продукта, ако уплътнението на бутилките е отворено или повредено при доставката на комплекта. Загрейте реактиви 1, 2 и 3 до 37°C за 30 минути. (Забележка: в Реактив 1 може да се появи утайка, но тя изчезва при предварително затопляне)

МЕТОД НА EPISCREEN PLUS

Графично представяне на протокола и описание:



1. За всяка проба от сперма (плазма), която ще се анализира:
 - направете реакционен разтвор: 3 μl от Реактив 2 (субстратен разтвор) в 147 μl от Реактив 1 (реакционен буфер)
 - направете инхибиращ разтвор: 3 μl от Реактив 2 (субстратен разтвор) в 147 μl от Реактив 3 (инхибиращ разтвор)
2. Пипетирайте по 20 μl от всяка проба от сперма (плазма) в две епруветки Eppendorf от по 1,5 ml;
3. Добавете 130 μl реакционен разтвор в единия реакционен съд и 130 μl инхибиращ разтвор в другия (за отрицателна контрола);
4. Вортексирайте и инкубирайте за точно 2 часа при 37°C в терморегулирана топла водна баня, термошейкър за реакционни епруветки или топлинен блок (избягвайте използването на въздушен инкубатор: това може да влоши резултата от анализа!);

5. По време на инкубацията на пробите от сперма (плазма) пригответе разрежданията за стандартната крива за PNP:
 - a. Пригответе най-високия стандарт от 200 μM: разтворете 100 μl от Реактив 5 (основен разтвор на стандарта) в 2400 μl от Реактив 6 (буфер за разреждане на стандарта). Разбъркайте внимателно.
 - b. Използвайте този разтвор, за да пригответе другите стандарти, както е посочено в таблицата по-долу. Реактив 6 самостоятелно служи като 0 μM стандарт за PNP (празна проба).

Разреждания на стандарта за PNP

Стандарти за PNP	200 μM стандарт	Реактив 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 (= празна проба)	0 μl	500 μl

- След 2-часова инкубация на пробите (реакция и инхибитор), спрете реакцията: извадете епруветките от топлинния блок/топлата водна баня/термалния шейкър, добавете 1 ml от Реактив 4 (стопиращ буфер) и вортексирайте;
- Пипетирайте 200 µl от всички проби и стандарти (приготвени в стъпка 5) в микротитърна плака. За предпочитане е това да се извърши в два екземпляра.
- Отчетете абсорбцията във фотометър при 405 nm.
- След всеки отделен тест всички използвани реактиви и материали трябва да се изхвърлят.

ИЗЧИСЛЯВАНЕ/ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

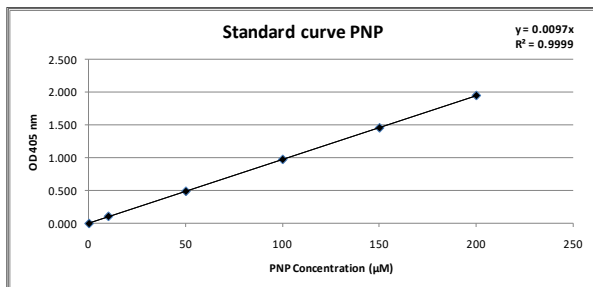


Изтеглете листа за изчисляване на Excel от нашия уебсайт и въведете данните в него, за да изчислите резултатите:

Принцип:

- Осреднете показанията на повторенията за всеки стандарт и проба;
- От всички показания за стандартите извадете средната стойност на абсорбцията на празната проба (0 µM стандарт за PNP) Това са абсорбциите, коригирани за празна проба. Използвайте само тези коригирани за празна проба стойности при следващите изчисления.
- Изчислете стандартната крива за PNP (концентрации на стандарта по оста X и коригираните за празна проба стойности на OD по оста Y). Използвайте линейна регресия, за да изчислите наклона. Коефициентът на детерминация (R²) трябва да бъде ≥0,99.
- За всяка проба от реакцията: извадете фона на семенната плазма (ODРЕАКЦИЯ – съответния ODИНХИБИТОР). Това са коригираните спрямо фона абсорбции на пробите ви.
- Използвайте уравнението на регресионната крива, за да изчислите концентрацията на PNP в неизвестната проба (концентрация на PNP = коригирана спрямо фона стойност на OD/наклона).
- Изчислете ензимната активност (в mIU/ml), като умножите концентрацията на PNP по 0,479 (повече информация за това как е определен „корекционният коефициент“ може да намерите в раздела за често задавани въпроси на страницата на продукта на нашия уебсайт).
- Нормални стойности за неутрална алфа-глюкозидаза в човешка сперма/семенна плазма: ≥5,88 mIU/ml.

Пример



Данни от анализа и стандартна крива:

Наклон на кривата = 0.0097 (крива на уравнението: $y = 0.0097x$), $R^2 = 0.9999$

Празна оптична плътност (0 µM PNP стандарт) = 0.045;

$OD_{РЕАКЦИЯ} = 0.845 \rightarrow$ corrected for the blank: $0.845 - 0.045 = 0.800$

$OD_{ИНХИБИТОР} = 0.060 \rightarrow$ corrected for the blank: $0.060 - 0.045 = 0.015$

$OD_{ПРОБА, КОРИГИРАНА СПРЯМО ФОНА} = 0.800 - 0.015 = 0.785$

Концентрация на PNP = $0.785 / 0.0097 = 80.93 \mu M$

Ензимна активност на ml = $80.93 \mu M \times 0.479 = 38.76 mIU/ml$

ОГРАНИЧЕНИЯ НА МЕТОДА

EpiScreen Plus е помощно средство при диагностицирането на мъжкото безплодие и, както и при другите биологични тестове, тълкуването на резултатите трябва да се извършва в рамките на клиничните данни и данните от анамнезата. Трябва да се изключат други причини за недостатъчна епидидимална секреция, като хипоандрогенизъм или тежка атрофия на тестисите.

ЕКСПЛОАТАЦИОННИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Повторяемост и възпроизводимост: $CV_{intra} < 15\%$, $CV_{inter} < 15\%$

Граница на откриване: 1.66 mIU/ml

Обхват на измерване: 5.02 -95.8 mIU/ml

Гранична стойност: $\geq 5.88 mIU/ml$

СЪХРАНЕНИЕ/ИЗХВЪРЛЯНЕ

- EpiScreen Plus е стабилен в продължение на 24 месеца от датата на производство (дори след отваряне).
- Не използвайте продукта след изтичане на срока на годност.
- Съхранявайте реактивите при температура между 2°C и 8°C.
- Не замразявайте.
- Пазете от (слънчева) светлина.
- Подходящ за транспортиране или краткосрочно излагане на повишени температури (до 5 дни при 37°C).
- Реактивите трябва да се обезвредят в съответствие с местните разпоредби за обезвреждане на медицински изделия.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Всички човешки органични материали трябва да се считат за потенциално инфекциозни. С всички проби трябва да се работи както с такива, които могат да предадат ХИВ или хепатит. Винаги носете защитно облекло при работа с проби и реактиви (ръкавици, лабораторна престилка, предпазни средства за очи/лице). Реактиви 1,3 и 5 съдържат натриев азид.

Всеки възникнал сериозен инцидент (както е дефиниран в Европейския Регламент 2017/746 за медицинските изделия за инвитро диагностика) следва да се докладва на FertiPro NV и, ако е приложимо, на компетентния орган на държавата членка на ЕС, в която е установен потребителят и/или пациентът.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- 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
- Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, and Comhaire FH. (1998) Seminal plasma alpha-glucosidase activity and male infertility. *Hum Reprod*, 13: 591-595.
- 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, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021
- Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29

ТЕХНИЧЕСКА ПОДДРЪЖКА ЗА КЛИЕНТИТЕ










FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Belgium



2797

РЕЧНИК НА СИМВОЛИТЕ

Символи, както са определени в ISO 15223			
	Каталожен номер		Код на партидата
	Да се пази от слънчева светлина		Производител
	Вижте инструкциите за употреба		Срок на годност
	Инвитро диагностика		Температурна граница
Символ, както е определен в Регламент 2017/746 (IVDR)			
	Маркировка CE от нотифициран орган 2797		