

Kit de diagnostic permettant de déterminer l'activité de l'alpha-glucosidase neutre dans le sperme humain et le plasma séminal.

Référence du document : FP09 I87 R01 C.1 (ÉBAUCHE)

Mise à jour : 22/12/2022

Utilisation à des fins de diagnostic in vitro  
Réactif à usage professionnel uniquement.

INFORMATIONS GÉNÉRALES

EpiScreen Plus™ peut faciliter le diagnostic et la prise en charge de l'infertilité masculine. Ce test peut être utilisé pour déterminer l'activité de l'alpha-glucosidase neutre, une enzyme principalement sécrétée par l'épididyme<sup>1</sup>, dans le sperme (plasma).

L'activité de cette enzyme constitue un marqueur fiable du rôle de l'épididyme chez les patients présentant une concentration (très) faible de spermatozoïdes ou chez les patients azoospermiques, dont le taux d'androgènes sanguin est normal:

- Une très faible activité indique une obstruction bilatérale entre l'épididyme et le canal éjaculateur<sup>2</sup>.
- Une faible activité peut être le signe d'une obstruction partielle de l'épididyme<sup>2</sup>.
- Une activité enzymatique normale est attendue en cas d'obstruction au-dessus de la zone dans laquelle l'enzyme est sécrétée ou en cas d'azoospermie non obstructive (dysfonctionnement testiculaire)<sup>2,3</sup>.

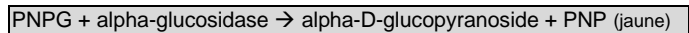
USAGE PREVU

EpiScreen Plus est un kit photométrique et diagnostique semi-quantitatif, non automatisé, destiné à détecter l'alpha-glucosidase neutre dans le sperme humain ou le plasma séminal. Il peut être utile dans le diagnostic et la prise en charge de l'infertilité masculine.

Un kit EpiScreen Plus™ permet d'effectuer 25 tests.

PRINCIPE DU TEST

Le principe de ce test repose sur la réaction suivante :



Dans des conditions spécifiées (pH = 6,8 ; T = 37 °C), 1 UI d'alpha-glucosidase libère 1 µmol de PNP par minute à partir du substrat PNPG<sup>5</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).

Remarque : Le tampon de réaction contient du SDS, qui inhibe sélectivement la forme acide de l'alpha-glucosidase provenant de la prostate. On obtient ainsi une détermination spécifique de l'activité enzymatique neutre<sup>4</sup>.

Remarque : La variance de fond des échantillons de sperme étant assez importante (+/- 20 %), il est recommandé de préparer un témoin négatif pour chaque échantillon de sperme (plasma) à l'aide de la solution inhibitrice. Cette solution inhibitrice contient du glucose, qui inhibe l'activité de l'alpha-glucosidase<sup>6</sup>.

MATÉRIEL INCLUS DANS LE KIT

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

Un certificat d'analyse et une fiche de données de sécurité sont disponibles sur demande ou peuvent être téléchargés sur notre site Internet ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)).

MATERIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

Lecteur de plaques, photomètre (filtre de 405 nm), agitateur thermique, bloc thermique ou bain-marie, pipette avec nouveaux embouts, tubes Eppendorf de 1,5 ml, plaque de microtitrage.

METHODE

Scanner le code-barres (ou suivre le lien sur [www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)) pour visionner la vidéo de démonstration.



PRELEVEMENT

Des récipients standard de collecte de sperme doivent être utilisés. Ils sont généralement fabriqués en polypropylène et soumis à des tests de survie/motilité des spermatozoïdes, lorsque l'échantillon de sperme est recueilli par masturbation. Des préservatifs en plastique non toxique pour les spermatozoïdes doivent être utilisés lorsqu'une collecte de sperme par masturbation n'est pas possible. Centrifuger l'échantillon de sperme, p. ex. à 3000 g pendant 10 à 15 minutes pour obtenir du plasma séminal sans sperme.

Le test peut être effectué sur du sperme frais ou congelé/décongelé et des échantillons de plasma séminal.

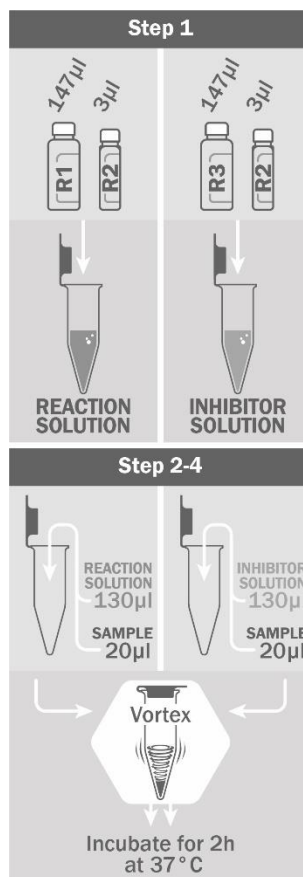
PREPARATION DU REACTIF

Ne pas utiliser le produit si le sceau des flacons est cassé ou endommagé lors de la livraison du kit.

Réchauffer les Réactifs 1, 2 et 3 à 37 °C pendant 30 minutes. (Remarque: une précipitation peut se former dans le Réactif 1, mais elle disparaîtra lors du préchauffage).

METHODE EPISCREEN PLUS

Présentation graphique du protocole et description:



1. Pour chaque échantillon de sperme (plasma) à analyser:

- Préparer une solution de réaction : 3 µl de Réactif 2 (solution de substrat) dans 147 µl de Réactif 1 (tampon de réaction)

- réparer une solution inhibitrice : 3 µl de Réactif 2 (solution de substrat) dans 147 µl de Réactif 3 (solution inhibitrice)

2. Pipeter 20 µl de chaque échantillon de sperme (plasma) dans deux tubes Eppendorf de 1,5 ml;

3. Ajouter 130 µl de solution réactionnelle dans une cuve de réaction et 130 µl de solution inhibitrice dans l'autre (pour obtenir un témoin négatif);

4. Passer au vortex et laisser incuber exactement 2 heures à 37 °C dans un bain-marie thermorégulé, un tube de réaction, un agitateur thermique ou un bloc thermique (éviter d'utiliser un incubateur à air, ce dernier pourrait altérer les résultats du test!);

5. Pendant l'incubation des échantillons de sperme (plasma), préparer les dilutions pour la courbe standard PNP:

a. Réaliser l'étalon le plus élevé de 200 µM : dissoudre 100 µl de Réactif 5 (solution mère standard) dans 2 400 µl de Réactif 6 (tampon de dilution standard). Mélanger délicatement.

b. Utiliser cette solution pour préparer les autres solutions étalon, comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Le Réactif 6 sert à lui seul d'étalon 0 µM PNP (blanc).

Dilutions d'étalons de PNP

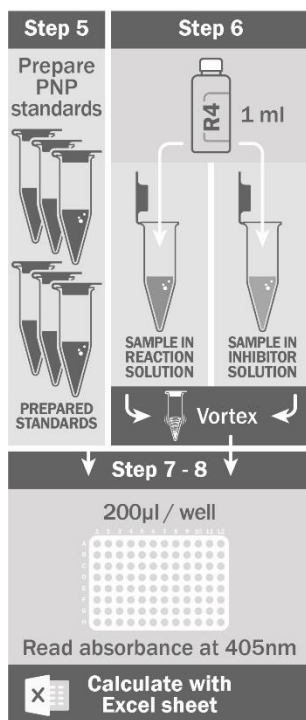
| Étalons de PNP | Solution étalon 200 µM | Réactif 6 |
|----------------|------------------------|-----------|
| 200 µM         | 500 µl                 | 0 µl      |
| 150 µM         | 375 µl                 | 125 µl    |
| 100 µM         | 250 µl                 | 250 µl    |
| 50 µM          | 125 µl                 | 375 µl    |
| 10 µM          | 25 µl                  | 475 µl    |
| 0 µM (= blanc) | 0 µl                   | 500 µl    |

- Après 2 h d'incubation des échantillons (réaction et inhibiteur), stopper la réaction: retirer les tubes du bloc thermique/du bain-marie/de l'agitateur thermique, ajouter 1 ml de réactif 4 (tampon d'arrêt) et passer au vortex;
- Pipeter 200 µl de l'ensemble des échantillons et étalons (préparés à l'étape 5) dans une plaque de microtitrage. Effectuer de préférence cette opération en double exemplaire.
- Lire l'absorbance dans un photomètre à 405 nm;
- Une fois chaque test terminé, jeter tous les réactifs et matériaux utilisés.

#### CALCUL/INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS



Télécharger la feuille de calcul Excel depuis notre site Web et renseigner les données dans la feuille pour pouvoir calculer les résultats.

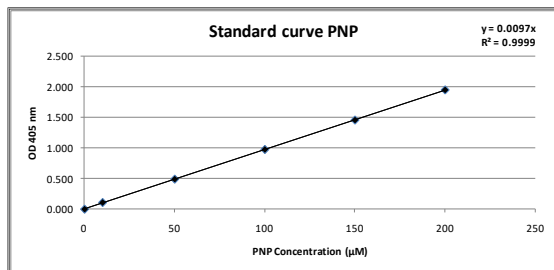


#### PRINCIPE :

- Faire la moyenne des deux lectures pour chaque solution étalon et échantillon.
- Soustraire la valeur d'absorbance moyenne du blanc (étalon PNP 0 µM) de toutes les lectures de solution étalon et d'échantillon. On obtient ainsi les absorbances corrigées au blanc. Utiliser uniquement ces valeurs corrigées au blanc dans les prochains calculs.
- Calculer la courbe PNP-étalon (concentrations étalon sur l'axe X et valeurs de DO corrigées au blanc sur l'axe Y). Effectuer une régression linéaire pour calculer la pente. Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) doit être  $\geq 0,99$ .
- Pour chaque échantillon de réaction : soustraire le fond plasmatique séminal (=  $DO_{\text{RÉACTION}}$  corrigée au blanc —  $DO_{\text{INHIBITEUR}}$  corrigée au blanc correspondante). Il s'agit des absorbances corrigées à partir de la valeur de base de vos échantillons.
- Utiliser l'équation de la courbe de régression pour calculer la concentration de PNP de l'échantillon inconnu (concentration de PNP = valeur DO corrigée au fond/pente).
- Calculer l'activité enzymatique (en mUI/ml) en multipliant la concentration de PNP par 0,479 (vous trouverez plus d'informations sur la façon dont le « facteur de correction » a été déterminé dans la FAQ sur la page produit de notre site Web).
- Valeurs normales pour l'alpha-glucosidase neutre dans le sperme humain/plasma séminal :  $\geq 5,88$  mUI/ml

#### Exemple

Données d'essai et courbe d'étalonnage:



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

DO blanc (étalon 0 µM PNP) = 0,045;

$DO_{\text{RÉACTION}} = 0,845 \rightarrow$  corrigée pour le blanc :  $0,845 - 0,045 = 0,800$   
 $DO_{\text{INHIBITEUR}} = 0,060 \rightarrow$  corrigée pour le blanc :  $0,060 - 0,045 = 0,015$   
 $DO_{\text{ÉCHANTILLON DO CORRIGÉ AU FOND}} = 0,800 - 0,015 = 0,785$

Concentration PNP =  $0,785/0,0097 = 80,93$  µM

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

#### LIMITES DE LA METHODE

EpiScreen Plus permet de faciliter le diagnostic de l'infertilité masculine. Comme pour les autres tests biologiques, les résultats doivent être interprétés en tenant compte des données cliniques et d'anamnèse disponibles. Les autres causes d'insuffisance de sécrétion épидидymaire telles que l'hypoandrogénie ou une atrophie testiculaire sévère doivent être exclues.

#### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Répétabilité et reproductibilité :  $CV_{\text{intra}} < 15\%$ ,  $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Limite de détection : 1,66 mUI/ml

Plage de mesure : 5,02 -95,8 mUI/ml

Limite :  $\geq 5,88$  mUI/ml

#### STOCKAGE/ELIMINATION

- EpiScreen Plus est stable pendant 24 mois à compter de la date de fabrication (même après ouverture).
- Ne pas utiliser le produit après la date de péremption.
- Conserver les réactifs entre 2 et 8 °C.
- Ne pas congeler
- Tenir à l'écart de la lumière du soleil.
- Convient au transport ou à une exposition de courte durée à des températures élevées (jusqu'à 5 jours à 37 °C)
- Les réactifs doivent être éliminés conformément aux réglementations locales relatives à l'élimination des dispositifs médicaux.

#### AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Toute matière organique humaine doit être considérée comme potentiellement infectieuse. Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient susceptibles de transmettre le VIH ou l'hépatite. Toujours porter des vêtements de protection lors de la manipulation des échantillons et des réactifs (gants, blouse de laboratoire, protection pour les yeux ou le visage). Les Réactifs 1,3 et 5 contiennent de l'azoture de sodium.

Tout incident grave (tel que défini dans le Règlement européen 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) doit être signalé à FertiPro NV et, le cas échéant, à l'autorité compétente de l'État membre de l'UE dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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  $\alpha$ -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29

#### ASSISTANCE TECHNIQUE












FertiPro NV  
Industriepark Noord 32  
8730 Beernem  
Belgique



EPI\_PLUS

GLOSSAIRE DES SYMBOLES

| Symboles tels que définis dans la norme ISO 15223                                 |  |   |                       |
|---|--|---|-----------------------|
|  | Référence catalogue                              |  | Numéro de lot         |
|  | Tenir à l'écart de la lumière du soleil          |  | Fabricant             |
|  | Consulter les instructions d'utilisation         |  | Date de péremption    |
|  | Diagnostics in vitro                             |  | Limite de température |
| Symbole tel que défini dans la norme IVDR 2017/746                                |  |   |                       |
|  | Marquage CE délivré par l'organisme notifié 2797 |   |                       |