

Διαγνωστικό kit για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης στο ανθρώπινο σπέρμα και στο σπερματικό πλάσμα.

Ταυτότητα εγγράφου: FP09 I87 R01 C.1

Ενημέρωση: 22/12/2022

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

Αντιδραστήριο μόνο για επαγγελματική χρήση.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Το EpiScreen Plus™ μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση και την αντιμετώπιση της ανδρικής στειρότητας. Η δοκιμασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης στο σπέρμα (πλάσμα), ενός ενζύμου που εκκρίνεται κυρίως από την επιδιδυμίδα¹.

Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για τη λειτουργία της επιδιδυμίδας σε ασθενείς με (πολύ) χαμηλή συγκέντρωση σπέρματος ή σε ασθενείς με αζωοσπερμία, οι οποίοι έχουν φυσιολογικά επίπεδα ανδρικών ορμονών στο αίμα:

- η πολύ χαμηλή δραστηριότητα υποδεικνύει αμφίπλευρη απόφραξη μεταξύ της επιδιδυμίδας και του εκσπερματιστικού πόρου²
- η χαμηλή δραστηριότητα μπορεί να αντικατοπτρίζει μερική απόφραξη της επιδιδυμίδας²
- φυσιολογική δραστηριότητα του ενζύμου αναμένεται όταν υπάρχει απόφραξη πάνω από την περιοχή στην οποία εκκρίνεται το ένζυμο ή σε περιπτώσεις μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας (δυσλειτουργία των όρχεων)^{2,3}.

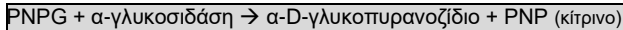
ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το EpiScreen Plus είναι ένα ημιποσοτικό, μη αυτοματοποιημένο, φωτομετρικό και διαγνωστικό kit για την ανίχνευση της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης στο ανθρώπινο σπέρμα ή στο σπερματικό πλάσμα και μπορεί να είναι χρήσιμο για τη διάγνωση και τη διαχείριση της ανδρικής στειρότητας.

Ένα kit EpiScreen Plus™ είναι σχεδιασμένο για 25 εξετάσεις.

ΑΡΧΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η αρχή της εξέτασης βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (pH=6,8, T=37°C), 1 IU α-γλυκοσιδάσης ελευθερώνει 1 μmol PNP το λεπτό από το υπόστρωμα PNPG⁵. Το κίτρινο χρώμα της PNP μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 405 nm. Η δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης εκφράζεται ως IU/λίτρο (ή mlU/ml).

Σημείωση: Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει SDS, το οποίο αναστέλλει επιλεκτικά την όξινη μορφή της α-γλυκοσιδάσης που προέρχεται από τον προστάτη. Αυτό επιτρέπει τον ειδικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του ουδέτερου ενζύμου⁴.

Σημείωση: Επειδή η απόκλιση υποβάθρου των δειγμάτων σπέρματος είναι αρκετά μεγάλη (+/- 20%), συνιστούμε να προετοιμάσετε έναν αρνητικό μάρτυρα για κάθε δείγμα σπέρματος (πλάσματος) χρησιμοποιώντας το διάλυμα αναστολέα. Αυτό το διάλυμα αναστολέα περιέχει γλυκόζη, η οποία αναστέλλει τη δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης⁶.

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΟ KIT

- Αντιδραστήριο Reagent 1 (5ml): ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (pH 6,8), συμπληρωμένο με 1% SDS.
- Αντιδραστήριο Reagent 2 (0,25ml): 50x διάλυμα υποστρώματος (PNPG σε DMSO)
- Αντιδραστήριο Reagent 3 (5ml): διάλυμα αναστολέα (ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης που περιέχει γλυκόζη)
- Αντιδραστήριο Reagent 4 (60ml): ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής (0,02M NaOH)
- Αντιδραστήριο Reagent 5 (1ml): πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (5mM PNP)
- Αντιδραστήριο Reagent 6 (60ml): πρότυπο ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (0,02M NaOH + 0,1% SDS)

Το πιστοποιητικό ανάλυσης και το ΔΔΑΥ είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος ή μπορούν να μεταφορτωθούν από τον ιστότοπό μας (www.fertipro.com).

Συσκευή ανάγνωσης πλακών, φωτόμετρο (φίλτρο 405nm), θερμαινόμενος ανακινητής, θερμομπλόκ ή θερμό υδατόλουτρο, μηχανική πιπέτα με ακριβή ρύγχη, σωληνάρια Eppendorf 1,5 ml, πλάκα μικροπιλοδότησης

ΜΕΘΟΔΟΣ

Σαρώστε τον γραμμωτό κώδικα (ή ακολουθήστε τον σύνδεσμο στο www.fertipro.com) για να παρακολουθήσετε το βίντεο επίδειξης:



ΔΕΙΓΜΑ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τυπικά δοχεία συλλογής σπέρματος, συνήθως από πολυπροπυλένιο και ελεγμένα ως προς την επιβίωση/κινητικότητα του σπέρματος, όταν το σπέρμα συλλέγεται με αυνανισμό. Μη τοξικά για το σπέρμα πλαστικά προφυλακτικά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όταν δεν είναι δυνατή η συλλογή σπέρματος με αυνανισμό. Φυγοκεντρήστε το δείγμα σπέρματος π.χ. στα 3000g για 10-15 λεπτά για να λάβετε σπερματικό πλάσμα χωρίς σπέρμα.

Η δοκιμασία μπορεί να εκτελεστεί σε δείγματα από φρέσκο ή κατεψυγμένο/αποψυγμένο σπέρμα και σπερματικό πλάσμα.

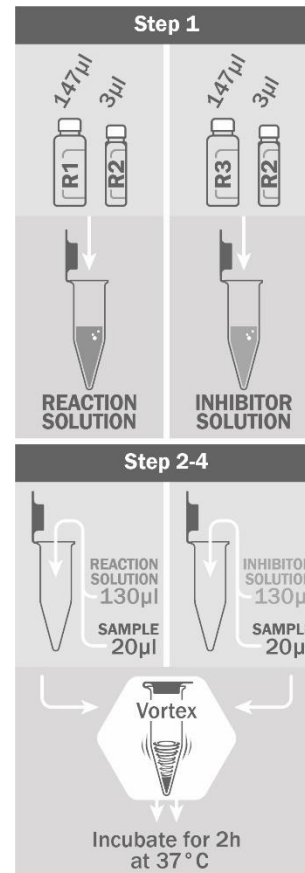
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Μη χρησιμοποιείτε το προϊόν εάν η σφράγιση των φιαλών είναι ανοιχτή ή είναι ελαττωματική κατά την παράδοση του kit.

Θερμάνετε τα αντιδραστήρια 1, 2 και 3 στους 37°C για 30 λεπτά. (Σημείωση: στο Reagent 1 μπορεί να εμφανιστεί καθίζηση, η οποία όμως εξαφανίζεται με την προθέρμανση)

ΜΕΘΟΔΟΣ EPISCREEN PLUS

Γραφική παρουσίαση του πρωτοκόλλου και της περιγραφής:



1. Για κάθε δείγμα σπέρματος (πλάσμα) προς ανάλυση:

– ετοιμάστε το διάλυμα αντίδρασης: 3μl Reagent 2 (διάλυμα υποστρώματος) σε 147μl Reagent 1 (ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης)

– ετοιμάστε το διάλυμα αναστολέα: 3μl Reagent 3 (διάλυμα υποστρώματος) σε 147μl Reagent 3 (ρυθμιστικό διάλυμα αναστολέα)

2. Μεταφέρετε με πιπέτα 20μl από κάθε δείγμα σπέρματος (πλάσμα) σε δύο σωληνάρια Eppendorf των 1,5ml.

3. Προσθέστε 130μl διαλύματος αντίδρασης στο ένα δοχείο αντίδρασης και 130μl διαλύματος αναστολέα στο άλλο (για αρνητικό μάρτυρα).

4. Αναμείξτε με vortex και επώαστε για ακριβώς 2h στους 37°C σε θερμό υδατόλουτρο αντίδρασης, έναν θερμαινόμενο ανακινητή σωληναρίων αντίδρασης με τις κατάλληλες υποδοχές ή θερμομπλοκ (αποφύγετε τη χρήση επωαστήρα με αέρα: αυτό μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα της δοκιμασίας!).

5. Κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων σπέρματος (πλάσμα), ετοιμάστε τις αραιώσεις για την πρότυπη καμπύλη PNP:

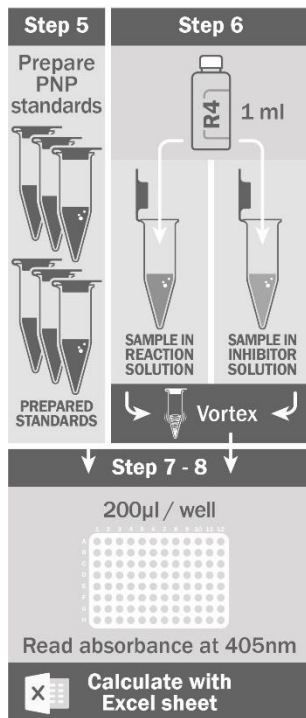
a. Ετοιμάστε το πρότυπο με την υψηλότερη συγκέντρωση 200 μM: αραιώστε 100 μl Reagent 5 (πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης) σε 2400μl Reagent 6 (πρότυπο ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης). Αναμείξτε ελαφρά.

b. Χρησιμοποιήστε το διάλυμα αυτό για να ετοιμάσετε τα υπόλοιπα πρότυπα, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα. Το Reagent 6 από μόνο του λειτουργεί ως πρότυπο PNP 0 μM (κενό).

Πρότυπες αραιώσεις PNP

Πρότυπα PNP	200 μM Προτύπου	Reagent 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 (= κενό)	0 μl	500 μl

- Μετά από 2 ώρες επώασης των δειγμάτων (αντίδρασης και αναστολέα), σταματήστε την αντίδραση: απομακρύνετε τα σωληνάρια από το θερμομπλόκ/θερμό υδατόλουτρο/θερμαινόμενο ανακινητή, προσθέστε 1 ml Reagent 4 (ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής) και αναμειξτε με vortex.
- Αναρροφήστε με πιπέτα 200μl από κάθε δείγμα και πρότυπο (που ετοιμάστηκαν στο βήμα 5) σε μια πλάκα μικροπιλοδότησης. Κατά προτίμηση, εκτελέστε αυτό το βήμα εις διπλούν.
- Διαβάστε την απορρόφηση σε φωτόμετρο στα 405nm.
- Μετά από κάθε μεμονωμένη εξέταση, όλα τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια και υλικά θα πρέπει να απορρίπτονται.



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ/ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



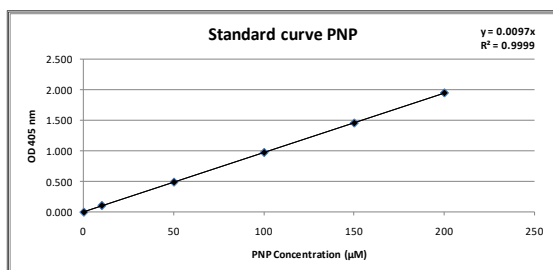
Μεταφορτώστε το φύλλο υπολογισμού για Excel από τον ιστότοπό μας και εισαγάγετε τα δεδομένα στο φύλλο για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.

ΑΡΧΗ:

- Υπολογίστε τον μέσο όρο της διπλής ένδειξης για κάθε πρότυπο και δείγμα.
- Αφαιρέστε τη μέση τιμή απορρόφησης του κενού (0 μM πρότυπο PNP) από όλες τις ενδείξεις προτύπων και δειγμάτων. Πρόκειται για τις διορθωμένες απορροφήσεις με κενό. Χρησιμοποιήστε μόνο αυτές τις διορθωμένες με κενά τιμές στους επόμενους υπολογισμούς.
- Υπολογίστε την πρότυπη καμπύλη PNP (πρότυπες συγκεντρώσεις στον άξονα X και τιμές OD διορθωμένες με κενό στον άξονα Y). Εκτελέστε γραμμική παλινδρόμηση για τον υπολογισμό της κλίσης. Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) θα πρέπει να είναι $\geq 0,99$.
- Για κάθε δείγμα αντίδρασης: διορθώστε ως προς το δικό του υπόβαθρο σπερματικού πλάσματος (Διορθωμένη $OD_{\text{ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ}} - \text{διορθωμένη αντίστοιχη } OD_{\text{ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ}}$). Αυτές είναι οι διορθωμένες ως προς το υπόβαθρο απορροφήσεις των δειγμάτων σας.
- Χρησιμοποιήστε την εξίσωση της καμπύλης παλινδρόμησης για να υπολογίσετε τη συγκέντρωση PNP του άγνωστου δείγματος (συγκέντρωση PNP = τιμή OD διορθωμένη ως προς το υπόβαθρο / κλίση)
- Υπολογίστε τη δραστηριότητα του ενζύμου (σε mIU/ml) πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση PNP με 0,479 (περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο προσδιορισμού του «συντελεστή διόρθωσης» μπορείτε να βρείτε στις Συχνές Ερωτήσεις στη σελίδα του προϊόντος στον ιστότοπό μας)
- Φυσιολογικές τιμές για την ουδέτερη α-γλυκοσιδάση στο ανθρώπινο σπέρμα/σπερματικό πλάσμα: $\geq 5,88\text{mIU/ml}$

Παράδειγμα

Δεδομένα δοκιμασίας και πρότυπη καμπύλη:



Κλίση της καμπύλης = 0,0097 (καμπύλη εξίσωσης: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

OD κενού (πρότυπο 0 μM PNP) = 0,045

$OD_{\text{ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ}} = 0,845 \rightarrow$ διορθωμένο ως προς το κενό: $0,845 - 0,045 = 0,800$

$OD_{\text{ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ}} = 0,060 \rightarrow$ διορθωμένο ως προς το κενό: $0,060 - 0,045 = 0,015$

$OD_{\text{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ}} = 0,800 - 0,015 = 0,785$

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

Ενζυμική δραστηριότητα ανά ml = $80,93 \mu\text{M} \times 0,479 = 38,76 \text{mIU/ml}$

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το EriScreen Plus αποτελεί βοήθημα στη διάγνωση της ανδρικής στειρότητας και, όπως και για άλλες βιολογικές εξετάσεις, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο κλινικών ευρημάτων και δεδομένων λήψης ιστορικού. Πρέπει να αποκλείονται άλλες αιτίες ανεπαρκούς επιδιδυμικής έκκρισης, όπως ο υποανδρογονισμός ή η σοβαρή ατροφία των όρχεων.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Όριο ανίχνευσης: 1,66 mIU/ml

Εύρος μέτρησης: 5,02 -95,8 mIU/ml

Όριο αποκοπής: $\geq 5,88\text{mIU/ml}$

ΦΥΛΑΞΗ / ΑΠΟΡΡΙΨΗ

- Το EriScreen Plus είναι σταθερό για 24 μήνες από την ημερομηνία παραγωγής (ακόμη και μετά το άνοιγμα).
- Μη χρησιμοποιείτε το προϊόν μετά την ημερομηνία λήξης.
- Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια μεταξύ 2°C και 8°C.
- Να μην καταψύχεται
- Να διατηρούνται μακριά από το (ηλιακό) φως.
- Κατάλληλο για μεταφορά ή βραχυπρόθεσμη φύλαξη σε υψηλές θερμοκρασίες (έως και 5 ημέρες στους 37°C)
- Τα αντιδραστήρια πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς για την απόρριψη των ιατροτεχνολογικών προϊόντων.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Κάθε ανθρώπινο, οργανικό υλικό θα πρέπει να θεωρείται δυνητικά λοιμώδες. Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα ως ικανά να μεταδώσουν HIV ή ηπατίτιδα. Να φοράτε πάντα προστατευτικό ρουχισμό όταν χειρίζεστε δείγματα και αντιδραστήρια (γάντια, ποδιά εργαστηρίου, προστασία ματιών/προσώπου). Τα αντιδραστήρια 1,3 και 5 περιέχουν αζίδιο του νατρίου.

Κάθε σοβαρό περιστατικό (όπως ορίζεται στον ευρωπαϊκό κανονισμό περί των in vitro διαγνωστικών ιατροτεχνολογικών προϊόντων 2017/746) θα πρέπει να αναφέρεται στη FertiPro NV και, κατά περίπτωση, στην αρμόδια αρχή του Ευρωπαϊκού κράτους μέλους της ΕΕ στο οποίο είναι εγκατεστημένος ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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 Cornhaire 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

ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ












FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Βέλγιο



EPI_PLUS



Σύμβολα όπως ορίζονται στο ISO 15223			
	Αριθμός καταλόγου		Κωδικός παρτίδας
	Διατηρείτε το προϊόν μακριά από το (ηλιακό) φως		Παρασκευαστής
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Ημερομηνία λήξης
	Προϊόντα διάγνωσης in vitro		Όριο θερμοκρασίας
Σύμβολο όπως ορίζεται στην ΟΙΠ 2017/746			
	Σήμανση CE από τον Κοινοποιημένο Οργανισμό 2797		