

EPISCREEN PLUS™

ΟΥΔΕΤΕΡΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΛΦΑ-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ (25 ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ) – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΗΣ ΑΛΦΑ-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ ΣΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΣΠΕΡΜΑ (ΠΛΑΣΜΑ).

Ταυτότητα εγγράφου: FP09 I87 R01 B.4 Ενημέρωση: 29/04/2019

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CLSI	Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων
CV	Συντελεστής διακύμανσης
IVD	Βοήθημα που χρησιμοποιείται στη διάγνωση in vitro
LOD	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης
OD	Οπτική πυκνότητα
PNP	Παρα(4)-νιτροφαινόλη
PNPG	Παρα(4)-νιτροφαινυλ-α-D-γλυκοκυρανοζίδιο
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το EpiScreen Plus™ είναι ένα διαγνωστικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση της ουδέτερης αλφα-γλυκοσιδάσης στο ανθρώπινο σπέρμα (πλάσμα). Η ενζυματική δραστηριότητα τουλάχιστον 25 δειγμάτων μπορεί να αξιολογηθεί με ένα kit EpiScreen Plus™. Μόνο για επαγγελματική χρήση.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Το μεγαλύτερο μέρος της δραστηριότητας της α-γλυκοσιδάσης στο σπέρμα, και ιδιαίτερα αυτή του ουδέτερου ισοενζύμου της, εξαρτάται από την έκκρισή της από την επιδιδυμίδα¹. Σε ασθενείς με αζωοσπερμία και φυσιολογικά επίπεδα ανδρογόνων στο περιφερικό αίμα, η δραστηριότητα της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης στο σπερματικό πλάσμα αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της συνεισφοράς της επιδιδυμίδας στο σπερματικό υγρό.

Οι άνδρες με αζωοσπερμία με αμφίπλευρη απόφραξη μεταξύ της επιδιδυμίδας και του σπερματικού πόρου έχουν πολύ χαμηλή δραστηριότητα α-γλυκοσιδάσης στο σπερματικό πλάσμα². Αντίθετα, εάν η αζωοσπερμία προκαλείται από αναστολή της σπερματικής ωρίμανσης, ή απόφραξη μεταξύ της επιδιδυμίδας και του ορχικού δικτύου, ή στο ίδιο το ορχικό δίκτυο, η δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης είναι φυσιολογική. Συνεπώς, η αξιολόγηση της δραστηριότητας της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης στο σπερματικό πλάσμα ανδρών με φυσιολογική ανάπτυξη φύλου και αζωοσπερμία μπορεί να οδηγήσει στη διάκριση μεταξύ των σημαντικών αιτιών της πάθησης αυτής^{3,4}.

Η χαμηλή δραστηριότητα της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης στο σπερματικό πλάσμα ασθενών με ολιγοζωοσπερμία μπορεί να αντικατοπτρίζει τη μερική απόφραξη των επιδιδυμιδίων, που συσχετίζεται με λοιμώξεις ή φλεγμονώδη νόσο^{2,5}. Η δραστηριότητα του ενζύμου σε ασθενείς με φυσιολογική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων συσχετίζεται με το αποτέλεσμα της χρώσης κατά Shorr του μέσου τμήματος και της ουράς, που αντικατοπτρίζει μεταβολές στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων, που επάγονται από την επιδιδυμική έκκριση⁵.

Η δοκιμασία EpiScreen Plus™ μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση και την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η αρχή της εξέτασης βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:

PNPG + α-γλυκοσιδάσης → α-D-γλυκοκυρανοζίδιο + PNP (κίτρινο)

Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (pH=6,8, T=37°C), 1 IU α-γλυκοσιδάσης ελευθερώνει 1 μM PNP το λεπτό από το υπόστρωμα PNP⁷. Το κίτρινο χρώμα της PNP μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 405 nm. Η δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης εκφράζεται με IU/λίτρο (ή mIU/mL).

Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει SDS, το οποίο επιλεκτικά αναστέλλει την όξινη μορφή της α-γλυκοσιδάσης που προέρχεται από τον προστάτη. Αυτό επιτρέπει τον ειδικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του ουδέτερου ενζύμου⁶.

Αναστολή: Η γλυκόζη αναστέλλει την α-γλυκοσιδάση όταν προσδένεται στο σημείο πρόσδεσης μονοσακχαριτών της α-γλυκοσιδάσης⁸. Η ανασταλτική διαδικασία αυτή αποτελεί φαινόμενο που εξαρτάται από το pH και τη δόση, και αποτελεί την δημιουργία δειγμάτων μαρτύρων σπέρματος (πλάσμα).

ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ

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

ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ

Αναγνώστης πλακών, φωτόμετρο (φίλτρο 405 nm), θερμαινόμενος ανακινητής ή θερμό υδατόλουτρο, μηχανική πιπέτα, σωληνάρια Eppendorf 1,5 ml, πλάκα μικροπιλοδότησης

ΦΥΛΑΞΗ, ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Κατάλληλο για μεταφορά ή βραχυπρόθεσμη φύλαξη σε υψηλές (έως και 5 ημέρες στους 37°C). Το EpiScreen Plus™ πρέπει να φυλάσσεται στους 2-8°C, προστατευμένο από το (ηλιακό) φως, και παραμένει σταθερό για 24 μήνες (ακόμη και ανοικτό). Να μη χρησιμοποιείται μετά από την ημερομηνία λήξης.

ΑΠΟΔΟΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Οι παράμετροι επικύρωσης έχουν υπολογιστεί βάσει των οδηγιών CLSI^{9,10}.

Εύρος μέτρησης: 2,32-144 mIU/ml	
CV εντός δοκιμασίας: 3,08 %	Ευαισθησία: 96,0 %*
CV μεταξύ δοκιμασιών: 10,52%	Ειδικότητα: 93,6 %
Τιμή αποκοπής: 6,35 mIU/ml	
Χαμηλότερο όριο αναφοράς σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ	
20 mIU/εκσπερμάτιση (εάν έχει γίνει διόρθωση ως προς τον όγκο του σπερματικού υγρού)	

* μετά από αγγειεκτομή / με φυσιολογικά επίπεδα σπερματοζωαρίων

ΕΛΕΓΧΟΙ ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΡΗΣΗ

Να μη χρησιμοποιείτε το προϊόν εάν το πώμα του περιέκτη έχει ανοιχτεί ή είναι ελαττωματικό κατά την παράδοση του προϊόντος. Όταν φυλάσσεται μεταξύ 2-8°C, μπορεί να δημιουργηθεί ίζημα στο αντιδραστήριο 1 αλλά αυτό θα διαλυθεί με προθέρμανση στους 37°C.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Συνιστούμε να παρακολουθήσετε το βίντεο επίδειξης (λήψη μέσω συνδέσμου από τον ιστότοπό μας, ή σάρωση του γραμμικού κώδικα π.χ. με την εφαρμογή «REA PhamaScan»):



Σημείωση 1: Ο ΠΟΥ συνιστά την εφαρμογή δύο δειγμάτων εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου για τη διόρθωση κενού δείγματος. Καθώς η διακύμανση υποβάθρου των δειγμάτων σπέρματος είναι αρκετά υψηλή (+/- 20%), συνιστούμε τη χρήση αρνητικού μάρτυρα για κάθε δείγμα σπέρματος (πλάσμα) για να επιτρέπεται η ορθή και αναπαράξιμη διόρθωση υποβάθρου.

Σημείωση 2: όταν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα χρειάζονται θέρμανση ή επώαση, να χρησιμοποιείτε πάντα θερμαινόμενο υδατόλουτρο ή θερμαινόμενο ανακινητή ή θερμαινόμενη πλάκα με υποδοχή για τα σωληνάρια των αντιδράσεων. ΜΗΝ επωάζετε σε επωαστικό κλίβανο αέρα καθώς αυτό μπορεί να επηρεάσει την έκβαση της δοκιμασίας.

Εκτελέστε τα εξής βήματα:

1. Θερμάνετε τα αντιδραστήρια 1, 2 και 3 στους 37°C για 30 λεπτά (θερμό υδατόλουτρο θερμός ή θερμομπλόκ).
2. Για κάθε δείγμα σπέρματος (πλάσμα) προς ανάλυση:
 - ετοιμάστε το **διάλυμα αντίδρασης**: 3 ml διαλύματος υποστρώματος (Reagent 2) σε 147 ml ρυθμιστού διαλύματος αντίδρασης (Αντιδραστήριο 1).
 - ετοιμάστε το **διάλυμα αναστολέα**: 3 ml διαλύματος υποστρώματος (Reagent 2) σε 147 ml διαλύματος αναστολέα (Reagent 3).

- Μεταφέρετε 20 μl από κάθε δείγμα σπέρματος (πλάσμα) σε δύο Erpendorf του 1,5 ml.
- Προσθέστε 130 μl διαλύματος αντίδρασης στο ένα σωληνάριο αντίδρασης και 130 μl διαλύματος αναστολέα στο άλλο (για αρνητικό μάρτυρα).
- Αναμίξτε με vortex και επώαστε για ακριβώς 2h στους 37°C σε θερμό υδατόλουτρο ή θερμοιμόμενη πλάκα.
- Κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων σπέρματος (πλάσμα), ετοιμάστε τις αραιώσεις για την πρότυπη καμπύλη PNP:
 - Ετοιμάστε το πρότυπο με την υψηλότερη συγκέντρωση 200 μM: αραιώστε 100 μl πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης (Reagent 5) σε 2400 μl πρότυπου ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσεως (Reagent 6). Αναμείξτε ελαφρά.
 - Χρησιμοποιήστε το διάλυμα αυτό για να ετοιμάσετε τα υπόλοιπα πρότυπα, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα. Το Αντιδραστήριο 6 από μόνο του λειτουργεί ως πρότυπο 0 (κενό).

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

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

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

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

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

$$\text{Ενζυμική δραστηριότητα ανά συνολικό όγκο εκσπερμάτισης} = 38,76 \text{ mIU/ml} \times \text{όγκο σπερματικού υγρού (ml)}$$

Σημείωση 1: Η πρότυπη καμπύλη αποτελείται από σημεία μεταξύ 0-200 μM, καθώς τα περισσότερα δείγματα σπέρματος θα έχουν τιμές εντός του εύρους αυτού. Η γραμμικότητα της καμπύλης έχει καταδειχθεί έως 300 μM ωστόσο. Εάν είναι επιθυμητό, ο χειριστής μπορεί να αλλάξει τη καμπύλη αρχίζοντας από 300 μM, που αντιστοιχεί σε ενζυμική δραστηριότητα 144 mIU/ml.

Πρότυπες αραιώσεις PNP

Πρότυπα PNP	200 μM Πρότυπου	Αντιδραστήριο 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 2h επώασης των δειγμάτων (αντίδρασης και αναστολέα), σταματήστε την αντίδραση απομακρύνοντας τα φιαλίδια από το υδατόλουτρο ή το θερμομπλόκ και προσθέτοντας 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος διακοπής αντίδρασης (Reagent 4) και αναμίξτε με vortex.
- Αναρροφήστε με πιπέτα 200 μl από κάθε δείγμα και πρότυπο (που ετοιμάστηκαν στο βήμα 6) σε μια πλάκα μικροπιπλοδότησης.
- Διαβάστε την απορρόφηση σε φωτόμετρο στα 405nm

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

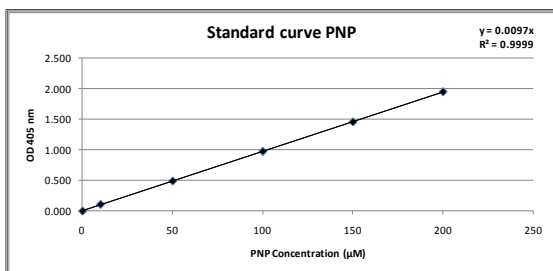
<http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=epiplus>

ΑΡΧΗ:

- Διορθώστε όλες τις καταγεγραμμένες τιμές OD με την τιμή OD κενού (0 μM πρότυπο PNP). Μόνο αυτές οι διορθωμένες τιμές θα χρησιμοποιηθούν περαιτέρω στους επόμενους υπολογισμούς.
- Υπολογισμός της πρότυπης καμπύλης PNP, με τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων στον Χ άξονα και τις διορθωμένες τιμές OD στον Ψ άξονα. Στη συνέχεια, 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_{ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ} – Διορθωμένη αντίστοιχη OD_{ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ})
- Χρησιμοποιήστε την εξίσωση της καμπύλης παλινδρόμησης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης PNP του άγνωστου δείγματος (συγκέντρωση PNP = τιμή OD διορθωμένη ως προς το υπόβαθρο / κλίση)
- Υπολογίστε την ενζυμική δραστηριότητα (σε mIU/ml) πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση PNP με τη τιμή 0,479 (βλ. ενότητα «συντελεστής διόρθωσης» παρακάτω)
Η υπολογισμένη ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να πολλαπλασιαστεί με τον σπερματικό όγκο για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας στον συνολικό όγκο εκσπερμάτισης.

Παράδειγμα

Δεδομένα δοκιμασίας και πρότυπη καμπύλη:



standard curve PNP = πρότυπη καμπύλη PNP
PNP concentration = συγκέντρωση PNP

Κλίση καμπύλης = 0,0097 (καμπύλη εξίσωσης: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$
OD κενού (πρότυπο 0 μM PNP) = 0,045

Σημείωση 2: ο συντελεστής διόρθωσης 0,479 έχει προσδιοριστεί βάσει του συντελεστή αραιώσεως δειγμάτων και του χρόνου επώασης (120 min):

Η δοκιμασία χρησιμοποιεί 20 μl δείγματος σπέρματος, το οποίο αραιώνεται σε αντιδραστήρια στα 1150 μl, επιφέροντας συντελεστή αραιώσεως 57,5. Μία μονάδα ενζύμου ορίζεται ως σχηματισμός 1μmol PNP ανά λεπτό. Συνεπώς, ο συντελεστής αραιώσεως διαιρείται με το 120 για τον υπολογισμό της δραστηριότητας ανά λεπτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα έναν τελικό συντελεστή 0,479.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Η εξέταση αυτή αποτελεί βοηθητικό μέσο για τη διάγνωση, και όπως και σε άλλες βιολογικές εξετάσεις, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο των κλινικών ευρημάτων και δεδομένων του ιστορικού. Πρέπει να αποκλείονται άλλες αιτίες ανεπαρκούς επιδιδυμικής έκκρισης, όπως ο υποανδρογονισμός ή η σοβαρή ατροφία των όρχεων.

Όλα τα υλικά πρέπει να χειρίζονται με ασφαλή τρόπο σύμφωνα με τις τοπικές/εθνικές νόρμες.

Κάθε ανθρώπινο, οργανικό υλικό θα πρέπει να θεωρείται δυνητικά λοιμώδες. Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα σαν να είναι ικανά να μεταδώσουν HIV ή ηπατίτιδα. Φοράτε πάντα προστατευτικό μαντιλάκι κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστήριου (γάντια, εργαστηριακή ποδιά, προστασία ματιών/προσώπου).

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
- Casano R, Orlando C, Caldini AL, Barni T, Natali A, and Serio M. (1987) Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha 1-4-glucosidase and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligospermic patients. *Fertil. Steril.*, 47: 324-328
- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, and Nieschlag E. (1988) Epididymal markers in human infertility. *J. Androl.*, 9: 91-101
- Haidl G, Badura B, Hinsch KD, Ghyczy M, Gareiss J, Schill WB. (1993) Disturbances of sperm flagelle due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum. Reprod.*, 7: 1070-1073
- 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, 5th edition. Measurement of neutral alpha-glucosidase in seminal plasma. pp. 134-136
- Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29
- Shrivastava A, Vipin B, Gupta VB (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2: 21-25
- Chesher D. (2008) Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem. Rev.*, 29: S23-S
- Eertmans F, Bogaert V, Van Poecke T, and Puype B. (2014) An Improved Neutral α-Glucosidase Assay for Assessment of Epididymal Function - Validation and Comparison to the WHO Method. *Diagnostics.* 4: 1-11

ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Βέλγιο

