

EPISCREEN PLUS™

NEUTRAAL ALFA-GLUCOSIDASE ASSAY (25 TESTEN) - IN VITRO
DIAGNOSTISCHE KIT VOOR DE KWANTITATIEVE METING VAN NEUTRAAL
ALFA-GLUCOSIDASE IN HUMAAN SPERMA (PLASMA)

Document ID: FP09 I87 R01 B.4 Update: 29/04/2019

AFKORTINGEN

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Coefficient of Variation
IVD	In Vitro Diagnostic Device
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
OD	Optical Density
PNP	Para (4)-Nitrophenol
PNPG	Para (4)-Nitrofenyl-alfa-D-glucopyranoside
SDS	Sodium dodecyl sulfate
WHO	World Health Organization

BEOOGD GEBRUIK

EpiScreen Plus™ is een In Vitro Diagnostic Device (IVD) voor de kwantitatieve meting van neutraal alfa-glucosidase in humaan sperma (plasma). De enzymatische activiteit van ten minste 25 stalen kan beoordeeld worden met een EpiScreen Plus™ kit.
Enkel voor professioneel gebruik.

ALGEMENE INFORMATIE

De alfa-glucosidase activiteit in sperma, en meer bepaald dat van zijn neutraal iso-enzym, hangt af van de secretie door de epididymis¹. In patiënten met azoöspermie en normale androgene levels in perifere bloed, is neutraal alfa-glucosidase activiteit in sperma plasma een betrouwbare merker van de epididymale bijdrage aan het ejaculaat.

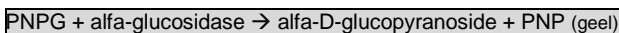
Azoöspermische mannen met bilaterale obstructie tussen de epididymis en het ejaculatie kanaal hebben een zeer lage alfa-glucosidase activiteit in hun seminaal plasma². Aan de andere kant, als azoöspermie te wijten is aan een stop in het spermamaturatieproces, of door een obstructie tussen de epididymis en de rete testis, of in de rete testis zelf, is de alfa-glucosidase activiteit normaal. Vandaar dat de beoordeling van neutraal alfa-glucosidase in seminaal plasma van normaal viriele mannen met azoöspermie een onderscheid kan maken tussen de verschillende oorzaken van deze aandoening^{3, 4}.

Lage neutraal alfa-glucosidase activiteit in seminaal plasma van patiënten met oligozoöspermie kan zich uiten als een partiële obstructie van de epididymis, samen met infecties of een inflammatoire ziekte^{2, 5}. Enzymactiviteit in patiënten met een normale spermaconcentratie is gecorreleerd met het resultaat van de Shorr-kleuring van het middenstuk en staart, wat veranderingen in het spermamembraan aangeeft, als gevolg van een epididymale secretie⁵.

De EpiScreen Plus™ assay kan helpen in de diagnose en de behandeling van mannelijke fertiliteit.

ASSAY PRINCIPE

Het principe van de test is gebaseerd op de volgende reactie:



Onder specifieke condities (pH=6.8; T=37°C), zet 1 IU alfa-glucosidase per minuut het substraat PNPG om in 1 µmol PNP⁷. De gele kleur van PNP kan spectrofotometrisch gemeten worden bij 405 nm. Alfa-glucosidase activiteit wordt uitgedrukt als IU/Liter (of mIU/mL).

De reactiebuffer bevat SDS. SDS inhibeert selectief de zure vorm van alfa-glucosidase die afkomstig is van de prostaat. Dit laat een specifieke bepaling van de neutrale enzym activiteit toe⁶.

Inhibitie: Glucose inhibeert alfa-glucosidase door te binden aan de monosaccharide binding site van alfa-glucosidase⁸. Dit inhibitieproces is pH en dosis afhankelijk en is het principe achter het maken van controle sperma (plasma) stalen.

TYPE STAAL

De assay kan uitgevoerd worden op vers of bevroren/ontdooid sperma en seminaal plasma.

MATERIAAL AANWEZIG IN DE KIT

- Reagens 1 (5ml): reactiebuffer (pH 6.8), gesupplementeerd met 1% SDS
- Reagens 2 (0.25ml): 50x substraatoplossing (PNPG in DMSO)
- Reagens 3 (5ml): inhibitie oplossing (reactiebuffer met glucose)
- Reagens 4 (60ml): stopbuffer (0.02M NaOH)
- Reagens 5 (1ml): standaard stock oplossing (5mM PNP)

- Reagens 6 (60ml): standaard verdunningsbuffer (0.02M NaOH + 0.1% SDS)

Een certificaat van analyse en MSDS zijn beschikbaar op verzoek of kunnen gedownload worden op onze website (www.fertipro.com).

MATERIAAL NIET AANWEZIG IN DE KIT

Plate reader, fotometer (405nm filter), thermoshaker of warmwaterbad, pipetor, 1.5ml Eppendorf epjes, microtiterplaat

Bewaarcondities, Transport en Stabiliteit

De kit kan getransporteerd en kortstondig bewaard worden bij hogere temperaturen (tot 5 dagen op 37°C). EpiScreen Plus™ moet bewaard worden bij 2-8°C, beschermd van (zon)licht, en blijft stabiel gedurende 24 maanden (zelfs geopend). Niet gebruiken na de vervaldatum.

ASSAY PERFORMANTIE

Validatieparameters zijn berekend geweest aan de hand van de CLSI guidelines^{9,10}.

Meetbereik: 2.32-144 mIU/ml	
Intra-assay CV: 3.08 %	Sensitiviteit: 96.0 %*
Inter-assay CV: 10.52%	Specificiteit: 93.6 % *
Cut-off: 6.35 mIU/ml;	
WHO lagere referentie limiet: 20 mIU/ejaculaat (wanneer het ejaculaat volume is gecorrigeerd)	

* gesteriliseerde/normozoöspermie

CONTROLE VOOR GEBRUIK

Product niet gebruiken als de verzegeling van de container geopend of defect is bij aankomst. Wanneer de kit bewaard wordt tussen de 2°C en 8°C kan er precipitatie voorkomen in Reagens 1. Deze verdwijnt na voorverwarmen tot 37°C.

METHODE

We raden aan om de demonstratie video te bekijken (download via link op onze website of scan de barcode):



Opmerking 1: De WHO geeft het advies om twee interne kwaliteitscontrole stalen als blanco correctie mee te nemen. Omdat de achtergrondvariatie van spermastalen best groot is (+/- 20%), raden we aan om een negatieve controle te maken voor elk sperma (plasma) staal zodat een correcte en herhaalbare achtergrondcorrectie kan bekomen worden.

Opmerking 2: Gebruik altijd een thermo-gereguleerd warmwater bad of een gepaste reactiebuis thermoshaker of hitteblok, wanneer reagentia of stalen moeten opgewarmd of geïncubeerd worden. Incubeer NIET in een luchtincubator want dit kan de resultaten beïnvloeden.

Voer de volgende stappen uit:

1. Warm reagentia 1, 2 en 3 op tot 37°C gedurende 30 minuten (warmwater bad, thermoshaker en hitteblok).
2. Maak voor elk te testen sperma (plasma) staal:
 - een **reactie oplossing**: 3µl substraatoplossing (Reagens 2) in 147µl reactiebuffer (Reagens 1).
 - een **inhibitie oplossing**: 3µl substraatoplossing (Reagens 2) in 147µl inhibitie oplossing (Reagens 3).
3. Pipeteer 20µl van elk sperma (plasma) staal in twee 1.5ml Eppendorf epjes.
4. Voeg 130µl reactie oplossing toe aan één reactie epje en 130µl inhibitie oplossing aan het andere epje (als negatieve controle).
5. Vortex en incubeer exact 2 uur bij 37°C in een warmwater bad of hitteblok.
6. Tijdens de incubatie van de sperma (plasma) stalen, worden de verdunningen gemaakt voor de PNP-standaardcurve:
 - a. Maak de hoogste standaard van 200 µM: los 100 µl standaard stock oplossing (Reagens 5) op in 2400µl standaard verdunningsbuffer (Reagens 6). Mix voorzichtig.
 - b. Gebruik deze oplossing om de andere standaarden voor te bereiden zoals beschreven in onderstaande tabel. Reagens 6 op zich dient als 0 standaard (blanco).

Standaard verdunningen van PNP

PNP standaarden	200 µM Standaard	Reagens 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 (= blanco)	0 µl	500 µl

- Na 2 uur incubatie van de stalen (reactie en inhibitie), stop de reactie door de epjes uit de hitteblok/warmwater bad te verwijderen, 1 ml stopbuffer (Reagens 4) toe te voegen en te vortexen.
- Pipeteer 200 µl van alle stalen en standaarden (voorbereid als in stap 6) in een microtiterplaat.
- Lees de absorbantie af in een fotometer bij 405 nm.

BEREKENING VAN DE RESULTATEN

Download het Excel bestand van onze website en geef de resultaten in:

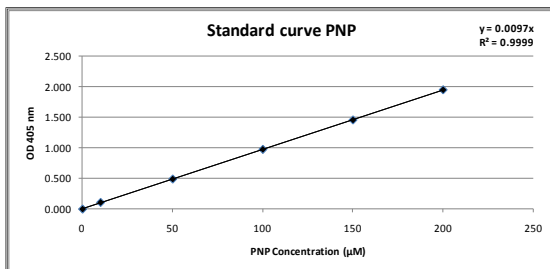
<http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=epiplus>

PRINCIPE:

- Corrigeer alle gemeten OD waarden met de blanco OD waarde (0 µM PNP standaard). Alleen deze gecorrigeerde waarden worden verder in de berekening gebruikt.
- Berekening van de PNP-standaardcurve, met op de X-as de standaardconcentraties en op de Y-as de gecorrigeerde OD waarden. Lineaire regressie wordt gedaan om de helling te bepalen. Coëfficiënt (R^2) zou ≥ 0.99 moeten zijn.
- Voor elk reactie staal: corrigeer voor zijn seminaal plasma achtergrond (= Gecorrigeerde $OD_{REACTIE}$ - Gecorrigeerde overeenkomstige $OD_{INHIBITOR}$)
- Gebruik de formule van de regressiecurve om de PNP concentratie van het ongekende staal te berekenen (PNP concentratie = achtergrond gecorrigeerde OD waarde / helling)
- Bereken de enzymactiviteit (in mIU/ml) door de PNP concentratie te vermenigvuldigen met 0.479 (zie sectie "correctiefactor" hieronder) De berekende enzymactiviteit kan vermenigvuldigd worden met het ejaculaatvolume om de enzymactiviteit te evalueren in het volledige ejaculaat.

Voorbeeld

Data en standaardcurve:



Helling van de curve = 0.0097 (equation curve: $y = 0.0097x$), $R^2 = 0.9999$
 Blanco OD (0 µM PNP standaard) = 0.045;

$OD_{REACTIE} = 0.845 \rightarrow$ gecorrigeerd voor de blanco: $0.845 - 0.045 = 0.800$

$OD_{INHIBITOR} = 0.060 \rightarrow$ gecorrigeerd voor de blanco: $0.060 - 0.045 = 0.015$

$OD_{ACHTERGROND\ GECORRIGEERD\ STAAL} = 0.800 - 0.015 = 0.785$

Concentratie PNP = $0.785 / 0.0097 = 80.93 \mu M$

Enzymactiviteit per ml = $80.93 \mu M \times 0.479 = 38.76 \text{ mIU/ml}$

Enzymactiviteit per ejaculaat = $38.76 \text{ mIU/ml} \times \text{ejaculaat volume (ml)}$

Opmerking 1: De standaardcurve bestaat uit punten tussen de 0-200 µM. De meeste spermastalen hebben waarden binnen dit bereik. Lineariteit van de curve is aangetoond tot 300 µM. Indien gewenst kan de uitvoerder de curve aanpassen door te starten vanaf 300 µM, wat overeenkomt met een enzymactiviteit van 144 mIU/ml.

Opmerking 2: de correctiefactor 0.479 is gebaseerd op de staalverdunningsfactor en de incubatietijd (120 min):

De test gebruikt 20 µl van het spermastaal, verdund in reagentia tot 1150 µl. Dit geeft een verdunningsfactor van 57.5. Een enzymunit is gedefinieerd als de vorming van 1 µmol PNP per minuut. Daarom wordt de verdunningsfactor gedeeld door 120 om de activiteit per minuut te berekenen. Zo wordt een finale factor van 0.479 bekomen.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGEN

Deze test is een hulpmiddel bij de diagnose en, zoals bij andere biologische testen, moeten de resultaten geïnterpreteerd worden binnen het kader van een breder (klinisch) onderzoek en patiëntgegevens. Andere oorzaken van onvoldoende epididymale secretie, zoals hypo-androgenisme of erge testiculaire atrofie, moeten uitgesloten worden. Het materiaal moet behandeld worden op een veilige manier, volgens de lokale/nationale normen.

Humaan, organisch materiaal moet altijd als mogelijks infectieus worden beschouwd. Behandel alle specimens alsof ze HIV of hepatitis kunnen overdragen. Draag altijd beschermende kledij wanneer er gewerkt wordt met stalen en reagentia (handschoenen, labovest, oog/gezichtsbescherming).

BIBLIOGRAFIE

- 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, 10th 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

TECHNISCHE ONDERSTEUNING



FertiPro NV
 Industriepark Noord 32
 8730 Beernem
 Belgium



EPI_PLUS