

EPISCREEN PLUS™

Kit de diagnóstico para determinar a atividade neutra da alfa-glicosidase no sêmen humano e no plasma seminal.

ID do documento: FP09 I87 R01 C.1

Atualização: 22/12/2022

Para uso em diagnóstico *in vitro*
Reagente somente para uso profissional.

INFORMAÇÕES GERAIS

O EpiScreen Plus™ pode auxiliar no diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina. Este ensaio pode ser usado para determinar a atividade da alfa-glicosidase neutra no sêmen (plasma), uma enzima que é secretada principalmente pelo epidídimo¹.

A atividade dessa enzima é um marcador confiável da função do epidídimo em pacientes com concentração de espermatozoides (muito) baixa ou pacientes azoospermicos, com um nível normal de andrógeno no sangue:

- atividade muito baixa indica uma obstrução bilateral entre o epidídimo e o ducto ejaculatório².
- baixa atividade pode refletir uma obstrução parcial do epidídimo².
- a atividade enzimática normal é esperada quando há uma obstrução acima da área em que a enzima é secretada ou em casos de azoospermia não obstrutiva (disfunção testicular)^{2,3}.

OBJETIVO PRETENDIDO

O EpiScreen Plus é um kit semiquantitativo, não automatizado, fotométrico e de diagnóstico para detectar alfa-glicosidase neutra no sêmen humano ou plasma seminal e pode ser útil para o diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina.

Um kit EpiScreen Plus™ foi projetado para 25 testes.

PRINCÍPIO DO TESTE

O princípio do teste é baseado na seguinte reação:

PNPG + alfa-glicosidase → alfa-D-glicopiranosídeo + PNP (amarelo)

Sob condições especificadas (pH = 6,8; T = 37°C), 1 UI de alfa-glicosidase libera 1 µmol PNP por minuto do substrato PNP⁵. A cor amarela do PNP pode ser medida espectrofotometricamente a 405 nm. A atividade da alfa-glicosidase é expressa como UI/l (ou mUI/ml).

Nota: O tampão de reação contém SDS, que inibe seletivamente a forma ácida da alfa-glicosidase originada da próstata. Isso permite a determinação específica da atividade enzimática neutra⁴.

Nota: Como a variação de fundo das amostras de sêmen é muito grande (+/- 20%), recomendamos preparar um controle negativo para cada amostra de sêmen (plasma) usando a solução de inibição. Esta solução inibidora contém glicose, que inibe a atividade da alfa-glicosidase⁶.

MATERIAL INCLUSO NO KIT

- Reagente 1 (5 ml): tampão de reação (pH 6,8), suplementado com 1% de SDS
- Reagente 2 (0,25 ml): Solução de substrato 50x (PNPG em DMSO)
- Reagente 3 (5 ml): solução inibidora (tampão de reação contendo glicose)
- Reagente 4 (60 ml): tampão de parada (0,02M NaOH)
- Reagente 5 (1 ml): solução de estoque padrão (5 mM PNP)
- Reagente 6 (60 ml): tampão de diluição padrão (0,02M NaOH + 0,1% de SDS)

Um certificado de análise e uma FISPQ estão disponíveis mediante solicitação ou podem ser baixados em nosso site (www.fertipro.com).

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

Leitor de placas, fotômetro (filtro de 405 nm), termoagitador, bloco de calor ou banho-maria, pipeta com pontas frescas, tubos Eppendorf de 1,5 ml, placa de microtitulação

MÉTODO

Faça a leitura do código de barras (ou siga o link em www.fertipro.com) para ver o vídeo de demonstração.



ESPÉCIME

Recipientes padrão de coleta de sêmen devem ser usados, tipicamente em polipropileno e sobrevivência/motilidade espermática testada, quando o sêmen é coletado por masturbação. Preservativos de plástico não tóxicos para o sêmen devem ser usados quando a coleta de sêmen por masturbação não for possível. Centrifugue a amostra de sêmen, por exemplo, a 3000 g por 10-15 minutos para obter plasma seminal livre de espermatozoides.

O ensaio pode ser realizado em amostras de sêmen fresco ou congelado/descongelado e plasma seminal.

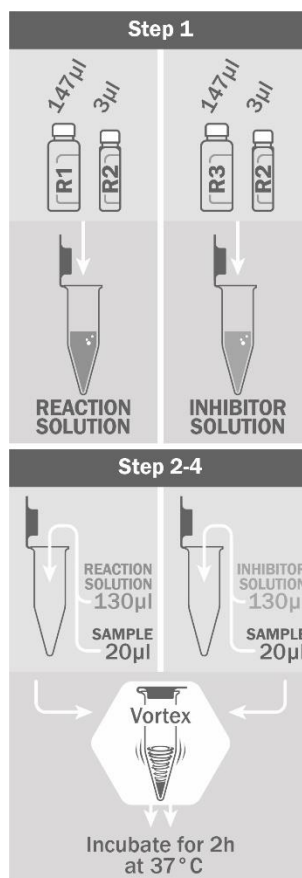
PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Não utilize o produto se o selo das garrafas estiver aberto ou defeito quando o kit é for entregue.

Aqueça os reagentes 1, 2 e 3 até 37°C por 30 minutos. (Nota: a precipitação pode ocorrer no Reagente 1, mas desaparece por pré-aquecimento)

MÉTODO EPISCREEN PLUS

Apresentação gráfica do protocolo e da descrição:



1. Para cada amostra de sêmen (plasma) a ser analisada:

– prepare a solução de reação: 3 µl de Reagente 2 (solução de substrato) em 147 µl de Reagente 1 (tampão de reação)

– prepare a solução inibidora: 3 µl de Reagente 2 (solução de substrato) em 147 µl de Reagente 3 (solução inibidora)

2. Pipete 20 µl de cada amostra de sêmen (plasma) em dois tubos Eppendorf de 1,5 ml;

3. Adicione 130 µl de solução de reação a um recipiente de reação e 130 µl de solução inibidora ao outro reação (para controle negativo);

4. Agite e incube por exatamente 2h a 37°C num banho-maria termostático, um termoagitador de tubo de reação adequado ou um bloco térmico (evite usar uma incubadora de ar: isso pode prejudicar o resultado do ensaio!);

5. Durante a incubação das amostras de sêmen (plasma), prepare as diluições para a curva padrão PNP:

a. Faça o padrão mais alto de 200 µM: dissolva 100 µl do Reagente 5 (solução de estoque padrão) em 2400 µl do Reagente 6 (tampão de diluição padrão). Misture delicadamente.

b. Use essa solução para preparar os outros padrões, conforme indicado na tabela abaixo. O reagente 6 sozinho serve como padrão PNP de 0 µM (em branco).

Diluições padrão de PNP

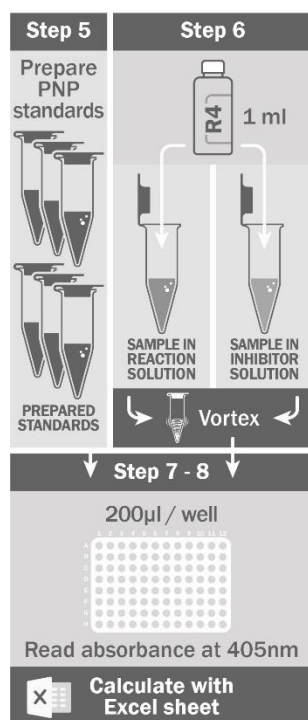
Padrões PNP	Padrão de 200 µM	Reagente 6
200 µM	500 µl	0 µl
150 µM	375 µl	125 µl
100 µM	250 µl	250 µl
50 µM	125 µl	375 µl
10 µM	25 µl	475 µl
0 µM (= em branco)	0 µl	500 µl

- Após 2h de incubação das amostras (reação e inibidora), interrompa a reação: remova os tubos do bloco de calor/banho-maria/termoagitador, adicione 1 ml de Reagente 4 (tampão de parada) e agite;
- Pipete 200 µl de todas as amostras e padrões (preparados na etapa 5) numa placa de microtitulação. De preferência, faça isso em duplicado.
- Leia a absorbância num fotômetro a 405 nm.
- Após cada teste individual, todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados.

CÁLCULO/INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS



Faça o download da planilha de cálculo do Excel em nosso site e insira os dados na planilha para calcular os resultados.

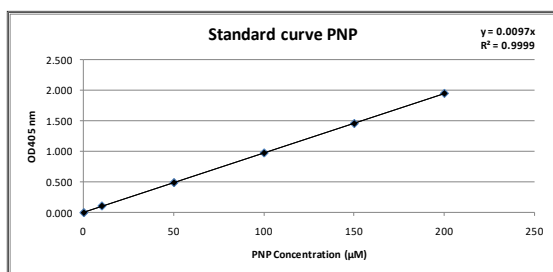


PRINCÍPIO:

- Faça a média da leitura duplicada para cada padrão e amostra.
- Subtraia o valor médio de absorbância do espaço em branco (padrão PNP 0 µM) de todas as leituras padrão e da amostra. Essas são as absorbâncias corrigidas em branco. Use somente esses valores corrigidos em branco nos próximos cálculos.
- Calcule a curva padrão PNP (concentrações padrão no eixo X e os valores de OD corrigidos em branco no eixo Y). Realize a regressão linear para calcular a inclinação. O coeficiente de determinação (R^2) deve ser $\geq 0,99$.
- Para cada amostra de reação: subtraia o fundo do plasma seminal (=OD_{REAÇÃO} corrigida em branco — OD_{INIBIDOR} correspondente corrigido em branco). Essas são as absorbâncias de fundo corrigidas de suas amostras.
- Use a equação da curva de regressão para calcular a concentração PNP da amostra desconhecida (Concentração de PNP = valor de OD corrigido pelo plano de fundo/inclinação)
- Calcule a atividade enzimática (em mUI/ml) multiplicando a concentração de PNP por 0,479 (mais informações sobre como o "fator de correção" foi determinado, podem ser encontradas no FAQ na página do produto em nosso site)
- Valores normais para alfa-glicosidase neutra em sêmen humano/plasma seminal: $\geq 5,88$ mUI/ml

Exemplo

Dados do ensaio e curva padrão:



Inclinação da curva = 0,0097 (curva da equação: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

OD em branco (padrão PNP de 0 µM) = 0,045;

OD_{REAÇÃO} = 0,845 → corrigida para o espaço em branco: $0,845 - 0,045 = 0,800$

OD_{INIBIDOR} = 0,060 → corrigido para o espaço em branco: $0,060 - 0,045 = 0,015$

OD_{AMOSTRA} CORRIGIDA DE FUNDO = $0,800 - 0,015 = 0,785$

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

Atividade enzimática por ml = $80,93 \mu\text{M} \times 0,479 = 38,76 \text{ mUI/ml}$

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

O EpiScreen Plus é um auxílio no diagnóstico de infertilidade masculina e, assim como para outros testes biológicos, a interpretação dos resultados deve ser realizada dentro da estrutura dos achados clínicos e dados da anamnese. Outras causas de secreção epididimal insuficiente devem ser excluídas, como hipoandrogenismo ou atrofia testicular grave.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Repetibilidade e reprodutibilidade: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Limite de detecção: 1,66 mUI/ml

Faixa de medição: 5,02 -95,8 mUI/ml

Corte: $\geq 5,88 \text{ mUI/ml}$

ARMAZENAMENTO/DESCARTE

- O EpiScreen Plus é estável por 24 meses a partir da data de fabricação (mesmo após a abertura).
- Não use o produto após a data de validade.
- Armazene os reagentes entre 2°C e 8°C.
- Não congelar
- Mantenha afastado da luz (do sol).
- Adequado para transporte ou exposição a curto prazo a temperaturas elevadas (até 5 dias a 37°C)
- Os reagentes precisam ser descartados de acordo com os regulamentos locais para descarte de dispositivos médicos.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Todo material orgânico humano deve ser considerado potencialmente infeccioso. Manuseie todas as amostras como se fossem capazes de transmitir HIV ou hepatite. Use sempre roupas de proteção ao manusear amostras e reagentes (luvas, jaleco, proteção ocular/facial). Os reagentes 1,3 e 5 contêm azida sódica.

Qualquer incidente grave (conforme definido no "Regulamento Europeu de Dispositivos Médicos para Diagnóstico In Vitro 2017/746) que tenha ocorrido, deve ser relatado à FertiPro NV e, se aplicável, à autoridade competente do Estado Membro da UE em que o usuário e/ou paciente está estabelecido.

BIBLIOGRAFIA

- 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

SUPORTE TÉCNICO



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Bélgica



EPI_PLUS

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Símbolos conforme definido pela norma ISO 15223			
	Número do catálogo		Código do lote
	Mantenha afastado da luz (do sol)		Fabricante
	Consulte as instruções de uso		Data de validade
	Diagnóstico in vitro		Limite de temperatura
Símbolo conforme definido pela norma IVDR 2017/746			
	Marcação CE por Órgão Notificado 2797		