

EPISCREEN PLUS™

Diagnostická súprava na stanovenie aktivity neutrálnej alfa-glukozidázy v ľudskej sperme a semennej plazme

ID dokumentu: FP09 I87 R01 C.1

Aktualizácia: 22/12/2022

Len na diagnostické použitie in vitro.

Reagencia je určená len na profesionálne použitie.

VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

EpiScreen Plus™ môže pomôcť pri diagnostike a liečbe neplodnosti u mužov. Tento test možno použiť na stanovenie aktivity neutrálnej alfa-glukozidázy v sperme (plazme), t. j. enzýmu vylučovaného najmä z nadsemenníkov¹.

Aktivita tohto enzýmu je spoľahlivým markerom funkcie nadsemenníkov u pacientov s (veľmi) nízkou koncentráciou spermií alebo u pacientov s azoospermiou, ktorí majú normálnu hladinu androgénov v krvi:

- veľmi nízka aktivita naznačuje bilaterálnu obštrukciu medzi nadsemenníkom a ejakulačným kanálom².
- nízka aktivita môže odrážať čiastočnú obštrukciu nadsemenníkov².
- normálna aktivita enzýmu sa očakáva v prípade obštrukcie nad oblasťou, kde sa enzým vylučuje, alebo v prípade neobštrukčnej azoospermie (porucha funkcie semenníkov)^{2,3}.

URČENÝ ÚČEL

EpiScreen Plus™ je semikvantitatívna, neautomatizovaná, fotometrická a diagnostická súprava na detekciu neutrálnej alfa-glukozidázy v ľudskej sperme alebo semennej plazme, ktorá môže pomôcť pri diagnostike a liečbu neplodnosti u mužov.

Jedna súprava EpiScreen Plus™ postačuje na 25 testov.

PRINCÍP TESTU

Princíp testu je založený na nasledujúcej reakcii:

PNPG + alfa-glukozidáza → alfa-D-glukopyranozid + PNP (žltá)

Za stanovených podmienok (pH = 6,8; T = 37 °C) 1 IU alfa-glukozidázy uvoľní zo substrátu PNPG⁵ 1 μmol PNP za minútu. Žlté sfarbenie PNP možno merať spektrofotometricky pri 405 nm. Alfa-glukozidázová aktivita sa vyjadruje v IU/l (alebo mIU/ml).

Poznámka: Reakčný pufer obsahuje SDS, ktorý selektívne inhibuje kyslú formu alfa-glukozidázy, ktorá pochádza z prostaty. To umožňuje špecifické stanovenie aktivity neutrálneho enzýmu⁴.

Poznámka: Keďže odchýlka pozadia vzoriek spermií je pomerne veľká (+/- 20 %), odporúčame pripraviť negatívny kontrolný roztok pre každú vzorku spermy (plazmy) použitím roztoku inhibítora. Roztok inhibítora obsahuje glukózu, ktorá inhibuje aktivitu alfa-glukozidázy⁶.

MATERIÁL, KTORÝ JE SÚČASŤOU SÚPRAVY

- Reagencia č. 1 (5 ml): reakčný pufer (pH 6.8) doplnený 1 % SDS
- Reagencia č. 2 (0,25 ml): 50x roztok substrátu (PNPG v DMSO)
- Reagencia č. 3 (5 ml): roztok inhibítora (reakčný pufer s glukózou)
- Reagencia č. 4 (60 ml): zastavovací roztok (0.02 M NaOH)
- Reagencia č. 5 (1 ml): štandardný zásobný roztok (5 mM PNP)
- Reagencia č. 6 (60 ml): štandardný riediaci pufer (0.02 M NaOH + 0.1 % SDS)

Osvedčenie o analýze a doklad o bezpečnosti materiálu (MSDS) sú k dispozícii na požiadanie alebo si ich môžete stiahnuť z našej webovej stránky (www.fertipro.com).

POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ NIE JE SÚČASŤOU DODÁVKY

Snímač platničiek, fotometer (filter 405 nm), termo trepačka, tepelný blok alebo teplý vodný kúpeľ, pipeta s novými špičkami, skúmavky Eppendorf 1.5 ml, mikrotitračná platnička

METÓDA

Naskenujte čiarový kód (alebo použite odkaz na stránke www.fertipro.com) a pozrite si video s ukážkou.



VZORKA

Pri odbere spermií masturbáciou je potrebné používať štandardné nádoby na odber spermií, zvyčajne polypropylénové, a zároveň by sa mal vykonať test prežitia/motility spermií. Ak odber spermy masturbáciou nie je možný,

je potrebné používať plastové kondómy, ktoré nie sú pre spermu toxické. Vzorku spermií odstreďujte napr. pri 3000 x g počas 10 až 15 minút, aby ste mohli získať semennú plazmu bez spermií.

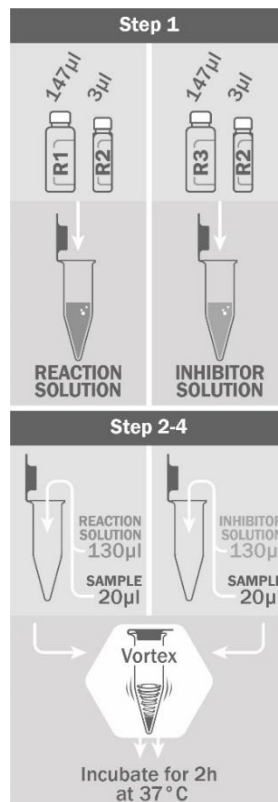
Test možno vykonať na čerstvých alebo zmrazených/rozmravených vzorkách spermy a semennej plazmy.

PRÍPRAVA REAGENCIÍ

Výrobok nepoužívajte, ak pri dodaní súpravy je uzáver fľaše otvorený alebo poškodený. Reagencie č. 1, 2 a 3 zahrejte na 37 °C počas 30 minút. (Poznámka: v reagenzii č. 1 sa môže vyskytnúť precipitát, ktorý po predhriatí zmizne)

METÓDA EPISCREEN PLUS

Grafické znázornenie protokolu a opis:



1. Pre každú vzorku spermy (plazmy), ktorá sa má analyzovať:
 - vytvoriť reakčný roztok: 3 μl reagenzie č. 2 (roztok substrátu) v 147 μl reagenzie č. 1 (reakčný pufer)
 - vytvoriť roztok inhibítora: 3 μl reagenzie č. 2 (roztok substrátu) v 147 μl reagenzie č. 3 (roztok inhibítora)

2. Napipetujte 20 μl každej vzorky spermy (plazmy) do dvoch 1.5 ml skúmaviek Eppendorf;

3. Do jednej reakčnej nádoby pridajte 130 μl reakčného roztoku a do druhej 130 μl roztoku inhibítora (na negatívnu kontrolu);

4. Premiešajte na vortexe a inkubujte presne 2 h pri teplote 37 °C v teplom vodnom kúpeli s termoreguláciou, v termo trepačke vhodnej pre reakčnú skúmavku alebo v tepelnom bloku (nepoužívajte vzduchový inkubátor: môže zhoršiť výsledok testu!);

5. Počas inkubácie vzoriek spermy (plazmy) pripravte riedenia pre štandardnú krivku PNP:

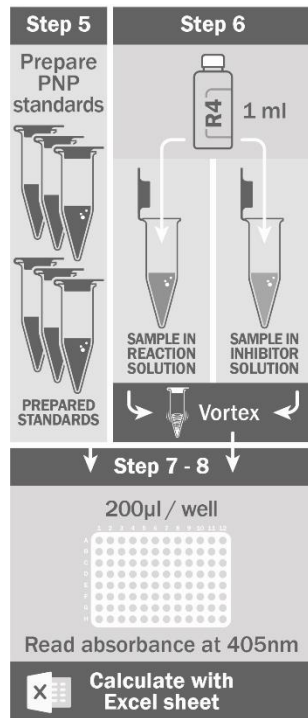
a. Vytvorte najvyšší štandard na úrovni 200 μM: rozpustíte 100 μl reagenzie č. 5 (štandardný zásobný roztok) v 2400 μl reagenzie č. 6 (štandardný riediaci pufer). jemne premiešajte.

b. Roztok použite na prípravu ostatných štandardov, ako je uvedené v tabuľke nižšie. Samotná reagencia č. 6 slúži ako PNP štandard 0 μM (slepý pokus).

Štandardné riedenia PNP

Štandardy PNP	Štandard 200 μM	Reagencia č. 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 (=slepý pokus)	0 μl	500 μl

- Po dvoch hodinách inkubácie vzoriek (reakcia a inhibítor) zastavte reakciu: vyberte skúmavky z tepelného bloku/teplého vodného kúpeľa/termo trepačky, pridajte 1 ml reagensie č. 4 (zastavovací roztok) a vortexujte.
- Napipetujte 200 µl všetkých vzoriek a štandardných roztokov (prípravených v kroku 5) do mikrotitračnej platničky. Podľa možnosti vykonajte tento postup duplicitne.
- Odčítajte absorbanciu na fotometri pri 405 nm.
- Všetky použité reagensie a materiály je potrebné po každom teste zlikvidovať.



VÝPOČET/INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

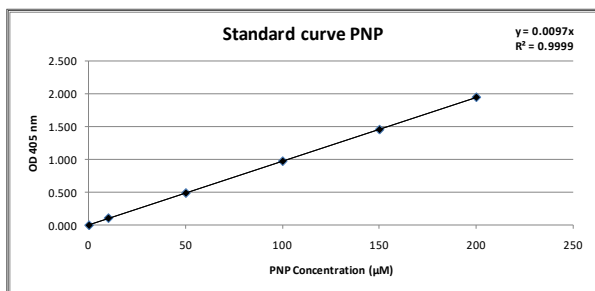


Z našej webovej stránky si stiahnite tabuľku pre Excel a zadajte do nej údaje na výpočet výsledkov:

PRINCÍP:

- Spriemerujte duplicitne odčítané hodnoty pre každý štandard a vzorku.
- Od všetkých nameraných hodnôt štandardov odpočítajte priemernú hodnotu absorbancie slepého pokusu (PNP štandard 0 µM). Tým získate absorpcie korigované vzhľadom na slepý pokus. Pri ďalších výpočtoch použite len hodnoty korigované na slepý pokus.
- Vypočítajte štandardnú krivku PNP (na osi X sa nachádzajú koncentrácie štandardov a na osi Y sú hodnoty optickej hustoty (OD) korigované na slepý pokus). Vykonajte lineárnu regresiu na výpočet smernice. Koeficient determinácie (R²) by mal byť ≥0.99.
- Pre každú reakčnú vzorku: odpočítajte pozadie semennej plazmy (OD_{REACTION} – príslušný OD_{INHIBITOR}). Ide o absorbancie vašich vzoriek korigované vzhľadom na pozadie (background-corrected sample).
- Na výpočet koncentrácie PNP neznámej vzorky použite rovnicu regresnej krivky (koncentrácia PNP = hodnota OD korigovaná na pozadie / smernica).
- Vypočítajte aktivitu enzýmu (v mIU/ml) vynásobením koncentrácie PNP koeficientom 0,479 (viac informácií o tom, ako bol stanovený „korekčný faktor“, nájdete v často kladených otázkach na stránke produktu na našej webovej stránke).
- Normálne hodnoty neutrálnej alfa-glukozidázy v ľudskej sperme/semenej plazme: ≥5.88 mIU/ml.

Príklad



Údaje z analýzy a štandardná krivka:

Smernica krivky = 0,0097 (krivka rovnice: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$
 Пазна оптична пълтност (0 µM PNP стандарт) = 0.045;

OD_{REACTION} = 0.845 → corrected for the blank: 0.845 - 0.045 = 0.800
 OD_{INHIBITOR} = 0.060 → corrected for the blank: 0.060 - 0.045 = 0.015
 OD_{BACKGROUND CORRECTED SAMPLE} = 0.800 - 0.015 = 0.785

Koncentrácia PNP = 0.785 / 0.0097 = 80.93 µM
 Aktivita enzýmu na 1 ml = 80.93 µM x 0.479 = 38.76 mIU/ml

OBMEDZENIA METÓDY

Test EpiScreen Plus slúži ako pomôcka pri diagnostike neplodnosti u mužov a jeho výsledky sa musia interpretovať – tak ako v prípade iných testov – spolu s klinickým nálezom a údajmi z anamnézy. Musia sa vylúčiť aj iné príčiny nedostatočnej epididymálnej sekrécie, ako je hypoandrogenizmus alebo závažná atfia semenníkov.

VÝKONNOSTNÉ CHARAKTERISTIKY

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť: CV_{intra} < 15%, CV_{inter} < 15%

Detekčný limit: 1.66 mIU/ml

Rozsah merania: 5.02 -95.8 mIU/ml

Medzná hodnota: ≥ 5.88mIU/ml

SKLADOVANIE/LIKVIDÁCIA

- EpiScreen Plus je stabilný 24 mesiacov od dátumu výroby (aj po otvorení).
- Výrobok nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie.
- Reagensie skladujte pri teplote od 2 °C do 8 °C.
- Nezmrazujte.
- Uchovávajte mimo (slnečného) žiarenia.
- Vhodné na prepravu alebo krátkodobé vystavenie pri zvýšenej teplote (do 5 dní pri 37 °C).
- Reagensie sa musia zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi na likvidáciu zdravotníckych pomôcok.

VAROVANIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Všetok ľudský organický materiál by sa mal považovať za potenciálne infekčný. So všetkými vzorkami zaobchádzajte, ako keby mohli prenášať HIV alebo hepatitídu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensiami noste vždy ochranný odev (rukavice, laboratórny plášť, ochranu očí/tváre) Reagensie č. 1, 3 a 5 obsahujú azid sodný.

V prípade akejkoľvek závažnej nehody (v zmysle vymedzenia tohto pojmu v „nariadení (EÚ) č. 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro“) je potrebné takúto udalosť nahlásiť spoločnosti FertiPro NV a v relevantných prípadoch príslušnému orgánu v členskom štáte, v ktorom má používateľ alebo pacient bydlisko.

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

TECHNICKÁ PODPORA PRE ZÁKAZNÍKOV












FertiPro NV
 Industriepark Noord 32
 8730 Beernem/ Belgium
 Tel +32 (0)50 79 18 05
 Fax +32 (0)50 79 17 99
 URL: www.fertipro.com
 E-Mail: info@fertipro.com



EPI_PLUS

SLOVNÍK SYMBOLOV

Symbol vymedzený v norme ISO 15223			
	Katalógové číslo		Kód šarže
	Uchovávejte mimo slnečného žiarenia		Výrobca
	Prečítajte si návod na použitie		Dátum spotreby
	Diagnostika in vitro		Teplotný limit
Symbol vymedzený v nariadení IVDR 2017/746			
	Označenie CE oboznámeným orgánom 2797		