

EPISCREEN PLUS™

Diagnose-Kit zur Bestimmung der neutralen α -Glucosidase-Aktivität in menschlichem Sperma und Samenplasma.

Dokument-ID: FP09 I87 R01 C.1

Aktualisierungsdatum: 22/12/2022

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik.
Reagens nur zur gewerblichen Verwendung.

ALLGEMEINE INFORMATIONEN

EpiScreen Plus™ kann bei der Diagnose und Behandlung männlicher Infertilität helfen. Dieser Test kann verwendet werden, um die neutrale α -Glucosidase-Aktivität im Sperma (Plasma) zu bestimmen, ein Enzym, das hauptsächlich vom Nebenhoden abgesondert wird.¹

Die Aktivität dieses Enzyms ist ein zuverlässiger Marker für die Nebenhodenfunktion bei Patienten mit (sehr) niedriger Spermienkonzentration oder Patienten mit Azoospermie und normalem Androgenblutspiegel:

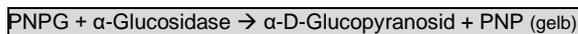
- Eine sehr geringe Aktivität weist auf eine beidseitige Obstruktion zwischen Nebenhoden und Ejakulationsgang hin.²
- Eine geringe Aktivität kann auf eine teilweise Obstruktion der Nebenhoden hinweisen.²
- Eine normale Enzymaktivität wird erwartet, wenn oberhalb des Bereichs, in dem das Enzym abgesondert wird, eine Obstruktion vorliegt oder in Fällen von nicht-obstruktiver Azoospermie (Hodenfunktionsstörung).^{2,3}

VERWENDUNGSZWECK

EpiScreen Plus™ ist ein semiquantitatives, nicht automatisiertes, photometrisches Diagnose-Kit zum Nachweis der neutralen α -Glucosidase in menschlichem Sperma oder Samenplasma und kann für die Diagnose und Behandlung männlicher Infertilität nützlich sein. Ein EpiScreen Plus™ Kit ist für 25 Tests ausgelegt.

TESTPRINZIP

Das Testprinzip basiert auf der folgenden Reaktion:



Unter bestimmten Bedingungen (pH = 6,8; T = 37°C) setzt 1 IE α -Glucosidase 1 μmol PNP pro Minute aus dem Substrat PNPG frei⁵. Die gelbe Farbe von PNP kann spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen werden. α -Glucosidase-Aktivität wird in IE/l (oder mIE/ml) angegeben.

Hinweis: Der Reaktionspuffer enthält SDS, das die saure Form der α -Glucosidase aus der Prostata selektiv hemmt. Dies ermöglicht eine spezifische Bestimmung der neutralen Enzymaktivität⁴.

Hinweis: Da die Hintergrundvarianz von Spermproben ziemlich groß ist (+/- 20%), empfehlen wir, für jede Spermprobe (Plasmaprobe) eine Negativkontrolle mit der Inhibitorlösung vorzubereiten. Diese Inhibitorlösung enthält Glucose, die die α -Glucosidase-Aktivität hemmt⁶.

IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

- Reagens 1 (5 ml): Reaktionspuffer (pH 6,8), ergänzt um 1 % SDS
- Reagens 2 (0,25 ml): 50x-Substratlösung (PNPG in DMSO)
- Reagens 3 (5 ml): Inhibitorlösung (Reaktionspuffer mit Glukose)
- Reagens 4 (60 ml): Stoppuffer (0,02 M NaOH)
- Reagens 5 (1 ml): Standard-Stammlösung (5 mM PNP)
- Reagens 6 (60 ml): Standard-Verdünnungspuffer (0,02 M NaOH + 0,1 % SDS)

Ein Analysezertifikat und ein Sicherheitsdatenblatt sind auf Anfrage erhältlich oder können von unserer Website (www.fertipro.com) heruntergeladen werden.

ERFORDERLICHES MATERIAL, DAS NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN IST

Plattenleser, Photometer (Filter 405 nm), Thermoshaker, Thermoblock oder Warmwasserbad, Pipette mit frischen Spitzen, 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen, Mikrotiterplatte

METHODE

Scannen Sie den Barcode (oder folgen Sie dem Link auf www.fertipro.com), um das Demonstrationsvideo anzusehen.



PROBEN

Bei der Spermagewinnung durch Masturbation sollten standardmäßige Spermabehälter verwendet werden, in der Regel aus Polypropylen, die auf das Überleben der Spermien bzw. auf Spermienmotilität getestet wurden. Wenn die Spermagewinnung durch Masturbation nicht möglich ist, sollten nicht spermatoxische Kunststoffkondome verwendet werden. Zentrifugieren Sie die Spermprobe z. B. bei 3000 g für 10–15 Minuten, um spermienfreies Samenplasma zu erhalten.

Der Test kann mit frischen oder gefrorenen/aufgetauten Sperma- und Samenplasma durchgeföhrt werden.

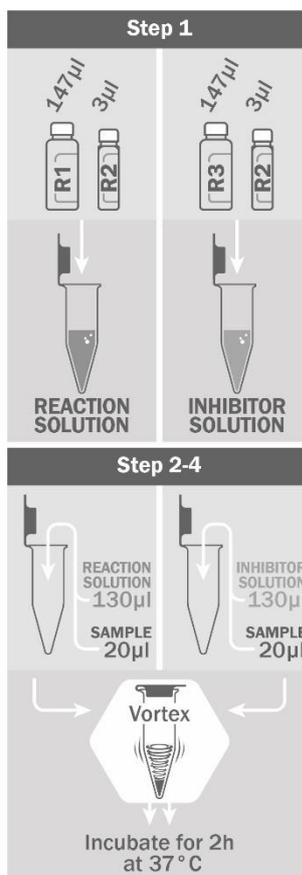
VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Verwenden Sie das Produkt nicht, wenn der Verschluss der Flaschen bei der Lieferung des Kits geöffnet oder defekt ist.

Erwärmen Sie die Reagenzien 1, 2 und 3 für 30 Minuten auf 37 °C. (Hinweis: Bei Reagens 1 kann sich eine Präzipitation bilden, die jedoch durch Vorwärmen verschwindet.)

METHODE EPISCREEN PLUS

Grafische Darstellung des Protokolls und Beschreibung:



1. Für jede zu analysierende Spermprobe (Plasmaprobe):

– **Reaktionslösung** herstellen:
3 μl Reagens 2 (Substratlösung) in 147 μl Reagens 1 (Reaktionspuffer)

– **Inhibitorlösung** herstellen:
3 μl Reagens 2 (Substratlösung) in 147 μl Reagens 3 (Inhibitorlösung)

2. 20 μl jeder Spermprobe (Plasmaprobe) in zwei 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen pipettieren;

3. 130 μl Reaktionslösung in ein Reaktionsgefäß und 130 μl Inhibitorlösung in das andere Reaktionsgefäß (für die Negativkontrolle) geben;

4. Mit einem Vortexmischer schütteln und genau 2 Std. bei 37 °C in einem thermostatgeregeltem Warmwasserbad, einem passenden Reaktionsröhrchen-Thermoshaker oder Thermoblock inkubieren (Verwendung eines Luftinkubators vermeiden: Dies kann das Testergebnis beeinträchtigen!);

5. Während der Inkubation der Spermproben (Plasmaproben) die Verdünnungen für die PNP-Standardkurve herstellen:

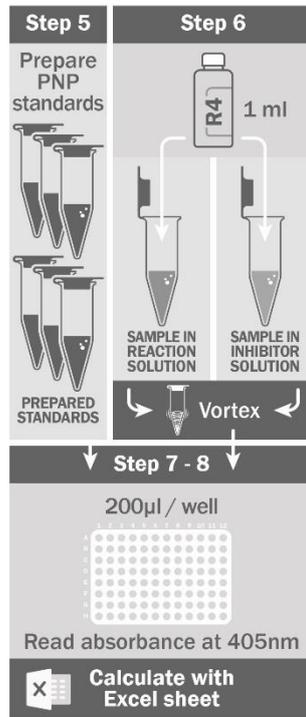
a. Den höchsten Standard von 200 μM herstellen: 100 μl von Reagens 5 (Standard-Stammlösung) in 2400 μl von Reagens 6 (Standard-Verdünnungspuffer) auflösen. Vorsichtig mischen.

b. Verwenden Sie diese Lösung, um die anderen Standards herzustellen, wie in der folgenden Tabelle angegeben. Reagens 6 allein dient als 0- μM -PNP-Standard (Blindprobe).

Standardverdünnungen von PNP

PNP-Standards	Standard 200 μM	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 (= blind)	0 μl	500 μl

- Reaktion nach einer 2-stündigen Inkubation der Proben (Reaktion und Inhibitor) anhalten: Röhrchen aus dem Thermoblock/ Warmwasserbad/ Thermoshaker entnehmen, 1 ml des Stopppuffers (Reagens 4) hinzufügen und im Vortexmischer schütteln;
- 200 µl aller Proben und Standards (vorbereitet in Schritt 5) in eine Mikrotiterplatte pipettieren. Dies vorzugsweise zweifach durchführen.
- Extinktion in einem Photometer bei 405 nm auslesen.
- Alle verwendeten Reagenzien und Materialien sollten nach jedem Test entsorgt werden.



BERECHNUNG/ INTERPRETATION DER ERGEBNISSE



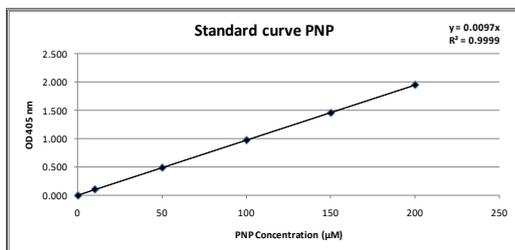
Laden Sie die Excel-Berechnungstabelle von unserer Website herunter und geben Sie Daten in die Tabelle ein, um die Ergebnisse zu berechnen.

PRINZIP:

- Mittelwert der zweifachen Messwerte für jeden Standard und jede Probe bilden.
- Den mittleren Extinktionswert der Blindprobe (0 µM PNP-Standard) von allen Standardmesswerten abziehen. Dies sind die anhand der Blindprobe korrigierten Extinktionen. Verwenden Sie in den nächsten Berechnungen nur diese anhand der Blindproben korrigierten Werte.
- Berechnen Sie die PNP-Standardkurve (Standardkonzentrationen auf der X-Achse und die anhand der Blindproben korrigierten OD-Werte auf der Y-Achse). Führen Sie eine lineare Regression durch, um die Steigung zu berechnen. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) sollte bei $\geq 0,99$ liegen.
- Für jede Reaktionsprobe: Samenplasma-Hintergrund abziehen (= $OD_{\text{REAKTION}} - \text{entsprechender } OD_{\text{INHIBITOR}}$). Dies sind die hintergrundkorrigierten Extinktionen Ihrer Proben.
- Verwenden Sie die Gleichung der Regressionskurve, um die PNP-Konzentration der unbekannt Probe zu berechnen. (PNP-Konzentration = hintergrundkorrigierter OD-Wert / Steigung)
- Berechnen Sie die Enzymaktivität (in mIE/ml), indem Sie die PNP-Konzentration mit 0,479 multiplizieren (weitere Informationen zur Bestimmung des „Korrekturfaktors“ finden Sie in den FAQ auf der Produktseite unserer Website).
- Normalwerte für die neutrale α -Glucosidase in menschlichem Sperma/Samenplasma: $\geq 5,88$ mIE/ml

Beispiel

Testdaten und Standardkurve:



Steigung der Kurve = 0,0097 (Gleichungskurve: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

$OD_{\text{REAKTION}} = 0,845 \rightarrow$ korrigiert für Leerwertmessung: $0,845 - 0,045 = 0,800$

$OD_{\text{REAKTION}} = 0,060 \rightarrow$ korrigiert für Leerwertmessung: $0,060 - 0,045 = 0,015$

$OD_{\text{HINTERGRUNDKORRIGIERTE PROBE}} = 0,800 - 0,015 = 0,785$

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

Enzymaktivität pro ml = $80,93 \mu\text{M} \times 0,479 = 38,76 \text{ mIE/ml}$

BESCHRÄNKUNGEN DER METHODE

Der EpiScreen Plus ist ein Hilfsmittel zur Diagnose der männlichen Infertilität, und wie bei anderen biologischen Tests muss die Interpretation der Ergebnisse im Rahmen der klinischen Befunde und der Daten der Anamnese erfolgen. Andere Ursachen für eine unzureichende Nebenhodensekretion, wie Hyperandrogenämie oder schwere Hodenatrophie, müssen ausgeschlossen werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit: $VK_{\text{intra}} < 15 \%$, $VK_{\text{inter}} < 15 \%$

Nachweisgrenze: 1,66 mIE/ml

Messbereich: 5,02–95,8 mIE/ml

Cut-Off-Wert: $\geq 5,88$ mIE/ml

LAGERUNG/ENTSORGUNG

- Der EpiScreen Plus ist ab dem Herstellungsdatum 24 Monate lang stabil (auch nach dem Öffnen).
- Das Produkt nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Die Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren.
- Nicht einfrieren
- Vor (Sonnen-)Licht schützen.
- Geeignet für den Transport oder die kurzzeitige Lagerung bei höheren Temperaturen (bis zu 5 Tage bei 37 °C)
- Die Reagenzien müssen in Übereinstimmung mit den örtlichen Entsorgungsvorschriften für Medizinprodukte entsorgt werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Alle organischen Materialien menschlichen Ursprungs sind als potenziell infektiös anzusehen. Alle Proben sind so zu handhaben, als könnten sie HIV oder Hepatitis übertragen. Bei der Handhabung von Proben und Reagenzien stets Schutzkleidung (Handschuhe, Laborkittel, Augen-/Gesichtsschutz) tragen. Die Reagenzien 1, 3 und 5 enthalten Natriumazid.

Auftretende schwerwiegende Vorkommnisse (nach der Definition der EU-Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika) sollten an FertiPro NV und ggf. an die zuständige Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Nutzer und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.

BIBLIOGRAPHIE

- 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

TECHNISCHER SUPPORT



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

SYMBOLERLÄUTERUNG

Symbole gemäß der Definition in ISO 15223			
	Bestellnummer		Chargencode
	Vor (Sonnen-)Licht schützen		Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten		Verfalldatum
	In-vitro-Diagnostik		Temperaturgrenze
Symbol gemäß der Definition in IVDR 2017/746			
	CE-gekennzeichnet durch die Benannte Stelle 2797		