

EPISCREEN PLUS™

Diagnostische kit voor de bepaling van neutraal alfa-glucosidase activiteit in humaan sperma en seminaal plasma.

Document referentie: FP09 I87 R01 C.1

Update: 22/12/2022

Enkel voor in vitro diagnostisch gebruik

Reagentia enkel voor professioneel gebruik

ALGEMENE INFORMATIE

EpiScreen Plus™ kan helpen bij de diagnose en behandeling van mannelijke onvruchtbaarheid. Deze test kan worden gebruikt om de neutraal alfa-glucosidase activiteit in sperma (plasma) te bepalen, een enzym dat voornamelijk door de epididymis wordt gesecreerd¹.

De activiteit van dit enzym is een betrouwbare marker voor de epididymisfunctie bij patiënten met een (zeer) lage spermaconcentratie of patiënten met azoöspermie met een normale androgeenbloedspiegel:

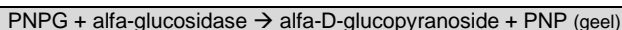
- Zeer lage activiteit wijst op een bilaterale obstructie tussen de epididymis en het ejaculatiekanaal².
- Lage activiteit kan wijzen op een gedeeltelijke obstructie van de epididymis².
- Normale enzymactiviteit wordt verwacht wanneer er een obstructie is boven het gebied waar het enzym wordt afgescheiden of in geval van niet-obstructieve azoöspermie (testiculaire disfunctie)^{2,3}.

BEOOGD GEBRUIK

EpiScreen Plus is een semi-kwantitatieve, niet-geautomatiseerde, fotometrische en diagnostische kit voor het detecteren van neutraal alfa-glucosidase in humaan sperma of seminaal plasma en kan nuttig zijn voor de diagnose en behandeling van mannelijke onvruchtbaarheid. Eén EpiScreen Plus™ kit is ontworpen voor 25 testen.

PRINCIPE VAN DE TEST

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



Onder bepaalde omstandigheden (pH=6,8; T=37°C) maakt 1 IU alfa-glucosidase 1 µmol PNP per minuut vrij uit substraat PNPG⁵. De gele kleur van PNP kan spectrofotometrisch worden gemeten bij 405 nm. De activiteit van alfa-glucosidase wordt uitgedrukt in IU/l (of mIU/ml).

Opmerking: De reactiebuffer bevat SDS, dat de zure vorm van alfa-glucosidase afkomstig van de prostaat selectief gaat inhiberen. Dit maakt een specifieke bepaling van de neutrale enzymactiviteit mogelijk⁴.

Opmerking: Omdat de achtergrondvariatie van spermastalen vrij groot is (+/- 20%), wordt aanbevolen om voor elk sperma (plasma) staal een negatieve controle te bereiden met behulp van de inhibitoroplossing. Deze inhibitoroplossing bevat glucose, dat de activiteit van alfa-glucosidase inhibeert⁶.

MATERIALEN INBEGREPEN BIJ DE TEST

- Reagens 1 (5ml): reactiebuffer (pH 6,8), aangevuld met 1% SDS
- Reagens 2 (0,25ml): 50x substraatoplossing (PNPG in DMSO)
- Reagens 3 (5ml): inhibitoroplossing (reactiebuffer met glucose)
- Reagens 4 (60ml): stopbuffer (0,02M NaOH)
- Reagens 5 (1ml): standaard stockoplossing (5mM PNP)
- Reagens 6 (60ml): standaard verdunningsbuffer (0,02M NaOH + 0,1% SDS)

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

BENODIGD MATERIAAL, NIET INBEGREPEN

Plaatlezer, fotometer (405nm filter), thermoshaker, hitteblok of warmwaterbad, pipet met nieuwe tips, Eppendorf buisjes van 1,5ml, microtiterplaat.

METHODE

Scan de barcode (of volg de link op www.fertipro.com) om de demonstratievideo te bekijken.



SPECIMEN

Wanneer het sperma door masturbatie wordt verkregen, moeten standaard spermacontainers worden gebruikt, meestal vervaardigd uit polypropyleen, die getest zijn op de overleving/bewegelijkheid van het sperma. Wanneer de afname van sperma door masturbatie niet mogelijk is, moeten niet-sequentoxische plastic condoms worden gebruikt. Centrifugeer het spermastaal bv. bij 3000g gedurende 10-15 minuten om spermavrij seminaal plasma te verkrijgen.

De test kan worden uitgevoerd op verse of bevroren/onthoede stalen van sperma en seminaal plasma.

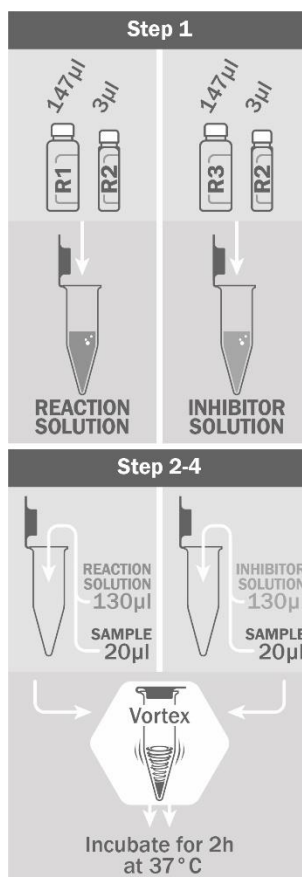
VOORBEREIDING VAN HET REAGENS

Gebruik het product niet als de verzegeling van de flessen geopend of defect is wanneer de kit wordt geleverd.

Verwarm de reagentia 1, 2 en 3 gedurende 30 minuten bij 37°C. (Opmerking: in reagens 1 kan er neerslag worden gevormd, maar dit verdwijnt weer door voorverwarming).

METHODE EPISCREEN PLUS

Grafische presentatie van het protocol en beschrijving:



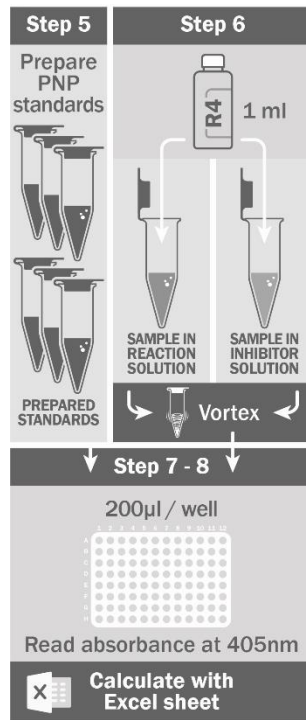
1. Voor elk te analyseren sperma (plasma) staal:
 - Maak reactieoplossing: 3µl Reagens 2 (substraatoplossing) in 147µl Reagens 1 (reactiebuffer)
 - Maak inhibitoroplossing: 3µl Reagens 2 (substraatoplossing) in 147µl Reagens 3 (inhibitoroplossing)
2. Pipetteer 20µl van elk sperma (plasma) staal in twee Eppendorf buisjes van 1,5ml;
3. Voeg 130µl reactieoplossing toe aan één reactiebuisje en 130µl inhibitoroplossing aan een het andere (voor de negatieve controle);
4. Vortex en incubeer gedurende precies 2 uur bij 37°C in een warmwaterbad met temperatuurregeling; een thermoshaker geschikt voor reageerbuisjes of een hitteblok (vermijd het gebruik van een luchtincubator; dit kan het resultaat van de test beïnvloeden!);

5. Bereid, tijdens de incubatie van de sperma (plasma) stalen, de PNP-standaardcurve voor:
 - a. Maak de hoogste standaard van 200µM: los 100µl van Reagens 5 (standaardstockoplossing) op in 2400µl van Reagens 6 (standaard verdunningsbuffer). Meng voorzichtig.
 - b. Gebruik deze oplossing om de andere standaarden te bereiden, zoals aangegeven in onderstaande tabel. Reagens 6 alleen dient als 0 µM PNP-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 inhibitor), stop de reactie: haal de buisjes uit het hitteblok/warmwaterbad/thermoshaker, voeg 1ml Reagens 4 (stopbuffer) toe en vortex;
- Pipetteer 200µl van alle stalen en standaarden (bereid in stap 5) in een microtiterplaat. Doe dit bij voorkeur in tweevoud.
- Lees de absorptantie af in een fotometer bij 405nm.
- Gooi na elke afzonderlijke test alle gebruikte reagentia en materialen weg.



BEREKENING/INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN



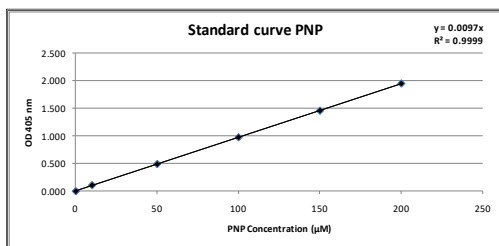
Download het Excel-rekenblad van onze website en voer de gegevens in het blad in om de resultaten te berekenen.

PRINCIPE:

- Bereken het gemiddelde van de dubbele meting voor elke standaard en elk staal.
- Trek de gemiddelde absorptantiewaarden van de blanco (0 µM PNP standaard) af van alle standaard metingen. Dit zijn de blanco gecorrigeerde absorptanties. Gebruik enkel deze blanco-gecorrigeerde waarden bij de volgende berekeningen.
- Bereken de PNP-standaardcurve (standaardconcentraties op de X-as en de blanco gecorrigeerde OD-waarden op de Y-as). Voer een lineaire regressie uit om de helling te berekenen. De determinatiecoëfficiënt (R^2) moet $\geq 0,99$ zijn.
- Voor elk reactiestaal: trek de achtergrond van het seminale plasma af ($OD_{REACTIE} - overeenkomstige OD_{INHIBITOR}$). Dit zijn de voor de achtergrond gecorrigeerde absorptanties van uw stalen.
- Gebruik de vergelijking van de regressiecurve om de PNP concentratie van het onbekende 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 (meer informatie over hoe de "correctiefactor" is bepaald, is terug te vinden in de FAQ op de productpagina van onze website).
- Normale waarden voor neutraal alfa-glucosidase in humaan sperma/seminaal plasma: $\geq 5,88$ mIU/ml

Voorbeeld

Testdata en standaardcurve:



Helling van de curve = 0,0097
(vergelijking curve: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

$OD_{REACTIE} = 0,845 \rightarrow$ gecorrigeerd voor blanco meting: $0,845 - 0,045 = 0,800$

$OD_{INHIBITOR} = 0,060 \rightarrow$ gecorrigeerd voor blanco meting: $0,060 - 0,045 = 0,015$

$OD_{ACHTERGROND\ GE Corrigeerd\ STAAL} = 0,800 - 0,015 = 0,785$

Concentratie PNP = $0,785 / 0,0097 = 80,93 \mu M$

Enzymactiviteit per ml = $80,93 \mu M \times 0,479 = 38,76$ mIU/ml

BEPERKINGEN VAN DE METHODE

EpiScreen Plus is een hulpmiddel bij de diagnose van mannelijke onvruchtbaarheid en net als bij andere biologische testen moeten de resultaten worden geïnterpreteerd in het kader van klinische bevindingen en anamnese gegevens. Andere oorzaken van onvoldoende epididymale secretie moeten worden uitgesloten zoals hypoandrogenisme of ernstige testiculaire atrofie.

PRESTATIEKENMERKEN

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid: $CV_{intra} < 15\%$, $CV_{inter} < 15\%$

Detectielimiet: 1,66 mIU/ml

Meetbereik: 5,02 -95,8 mIU/ml

Cut-off: $\geq 5,88$ mIU/ml

BEWAARCONDITIES/AFVULINSTRUCTIES

- EpiScreen Plus is 24 maanden houdbaar na productiedatum (zelfs na opening).
- Gebruik het product niet na vervaldatum.
- Bewaar reagentia tussen 2°C en 8°C.
- Niet invriezen.
- Verwijderd houden van (zon)licht.
- Geschikt voor transport of kortstondige blootstelling aan hoge temperaturen (tot 5 dagen bij 37°C).
- De reagentia moeten worden afgevoerd in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften voor het afvoeren van medische hulpmiddelen.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Al het humaan, organisch materiaal moet als potentieel besmettelijk worden beschouwd. Behandel alle stalen alsof ze HIV of hepatitis kunnen overdragen. Draag altijd beschermende kledij bij het hanteren van specimen en reagentia (handschoenen, labo's, oog-/gezichtsbescherming). Reagens 1, 3 en 5 bevatten natriumazide.

Elk ernstig incident (zoals gedefinieerd in de "Europese regelgeving voor in vitro diagnostiek 2017/746") dat zich heeft voorgedaan moet worden gerapporteerd aan FertiPro NV, en, indien van toepassing, aan de competente autoriteit van het EU lidstaat waar de gebruiker en/of patiënt is gevestigd.

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
- 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

KLANTEN-TECHNISCHE ONDERSTEUNING












FertiPro NV, Industriepark Noord 32
8730 Beernem - Belgium
E-mail: info@fertipro.com
URL: <https://www.fertipro.com>



EPI_PLUS

SYMBOLLEN WOORDENLIJST

Symbolen zoals gedefinieerd in ISO 15223-1			
	Catalogusnummer		Lotnummer
	Uit de buurt van (zon)licht houden		Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing		Vervaldatum
	In Vitro Diagnostiek		Temperatuurslimiet
Symbool zoals gedefinieerd in IVDR 2017/746			
	CE markering door Notified Body 2797		