

EPISCREEN PLUS™

Kit diagnostico per la determinazione dell'attività dell'alfa-glucosidasi neutra nel liquido seminale e nel plasma seminale umani.

ID documento: FP09 I87 R01 C.1

Aggiornamento: 22/12/2022

Per uso diagnostico in vitro

Reagente esclusivamente per uso professionale.

INFORMAZIONI GENERALI

EpiScreen Plus™ può essere di aiuto nella diagnosi e nella gestione dell'infertilità maschile. Questo saggio può essere utilizzato per determinare l'attività nel liquido seminale (plasma) dell'alfa-glucosidasi neutra, un enzima secreto principalmente dall'epididimo¹.

L'attività di questo enzima è un marcatore affidabile della funzionalità epididimaria nei pazienti con una concentrazione di spermatozoi (molto) bassa o nei pazienti azoospermici, con un normale livello ematico di androgeni:

- Un'attività molto bassa indica un'ostruzione bilaterale tra l'epididimo e il dotto eiaculatorio².
- Un'attività bassa può rispecchiare un'ostruzione parziale dell'epididimo².
- Un'attività enzimatica normale è prevista in presenza di un'ostruzione al di sopra dell'area in cui viene secreto l'enzima o in caso di azoospermia non ostruttiva (disfunzione testicolare)^{2,3}.

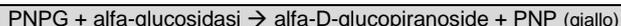
SCOPO PREVISTO

EpiScreen Plus è un kit semiquantitativo, non automatizzato, fotometrico e diagnostico per la rilevazione dell'alfa-glucosidasi neutra nel liquido seminale o nel plasma seminale umano e può essere utile per la diagnosi e la gestione dell'infertilità maschile.

Ogni singolo kit EpiScreen Plus™ è progettato per 25 test.

PRINCIPIO DEL TEST

Il principio del test si basa sulla seguente reazione:



In condizioni specifiche (pH=6,8; T=37 °C), 1 UI di alfa-glucosidasi libera 1 µmol di PNP al minuto dal substrato PNPG⁵. Il colore giallo di PNP può essere misurato spettrofotometricamente a 405 nm. L'attività dell'alfa-glucosidasi è espressa come UI/l (o mUI/ml).

Nota: il tampone di reazione contiene SDS, che inibisce selettivamente la forma acida dell'alfa-glucosidasi prodotta dalla prostata. Ciò consente di determinare in modo specifico l'attività dell'enzima neutro⁴.

Nota: poiché la varianza di fondo dei campioni di liquido seminale è piuttosto ampia (+/- 20%), si consiglia di preparare un controllo negativo per ogni campione di liquido seminale (plasma) utilizzando la soluzione di inibizione. Questa soluzione di inibizione contiene glucosio, che inibisce l'attività dell'alfa-glucosidasi⁶.

MATERIALI INCLUSI NEL KIT

- Reagente 1 (5 ml): tampone di reazione (pH 6,8), integrato con SDS all'1%.
- Reagente 2 (0,25 ml): 50x soluzione di substrato (PNPG in DMSO)
- Reagente 3 (5 ml): soluzione di inibizione (tampone di reazione contenente glucosio)
- Reagente 4 (60 ml): tampone di arresto (0,02 M di NaOH)
- Reagente 5 (1 ml): soluzione madre standard (5 mM di PNP)
- Reagente 6 (60 ml): tampone di diluizione standard (0,02 M di NaOH + SDS allo 0,1%)

Un certificato di analisi e la MSDS sono disponibili su richiesta o possono essere scaricati dal nostro sito web (www.fertipro.com).

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Letture di piastre, fotometro (filtro da 405 nm), termoagitatore, blocco termico o bagno d'acqua calda, pipetta con puntali nuovi, provette Eppendorf da 1,5 ml, piastra per microtitolazione

METODO

Scansionare il codice a barre (o seguire il link su www.fertipro.com) per vedere il video dimostrativo.



CAMPIONE

Dovrebbero essere utilizzati contenitori standard per la raccolta del liquido seminale, tipicamente in polipropilene e testati per la sopravvivenza/motilità degli spermatozoi, quando il liquido seminale viene raccolto mediante masturbazione. I preservativi in plastica non tossica per gli spermatozoi devono essere usati quando non sia possibile la raccolta del liquido seminale mediante masturbazione. Centrifugare il campione di sperma, ad es. a 3000 g per 10-15 minuti, al fine di ottenere plasma seminale privo di spermatozoi.

Il saggio può essere eseguito su campioni di liquido seminale e plasma seminale fresco o congelato/scongelato.

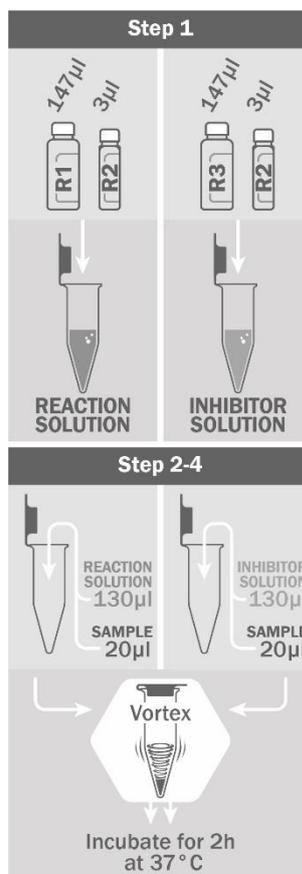
PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Non utilizzare il prodotto se il sigillo dei flaconi è aperto o difettoso quando il kit viene consegnato.

Riscaldare i reagenti 1, 2 e 3 a 37 °C per 30 minuti (nota: nel reagente 1 può verificarsi precipitazione che scompare con il preriscaldamento).

METODO EPISCREEN PLUS

Presentazione grafica del protocollo e descrizione:



1. Per ogni campione di liquido seminale (plasma) da analizzare:

– preparare la soluzione di reazione: 3 µl di reagente 2 (soluzione di substrato) in 147 µl di reagente 1 (tampone di reazione)

– preparare la soluzione di inibizione: 3 µl di reagente 2 (soluzione di substrato) in 147 µl di reagente 3 (soluzione di inibizione)

2. Pipettare 20 µl di ciascun campione di liquido seminale (plasma) in due provette Eppendorf da 1,5 ml;

3. Aggiungere 130 µl di soluzione di reazione in un recipiente di reazione e 130 µl di soluzione di inibizione nell'altro (per il controllo negativo);

4. Agitare con un vortex e incubare per 2 ore esatte a 37 °C in un bagno d'acqua calda termoregolato, in un idoneo termoagitatore per provette di reazione o in un blocco termico (evitare l'uso di un incubatore ad aria: potrebbe compromettere l'esito del saggio!);

5. Durante l'incubazione dei campioni di liquido seminale (plasma), preparare le diluizioni per la curva dello standard di PNP:

- Preparare lo standard più alto di 200 µM: sciogliere 100 µl di reagente 5 (soluzione madre standard) in 2400 µl di reagente 6 (tampone di diluizione standard). Mescolare delicatamente.
- Utilizzare questa soluzione per preparare gli altri standard, come indicato nella tabella seguente. Il reagente 6 da solo serve come standard di PNP da 0 µM (bianco).

Diluizioni standard di PNP

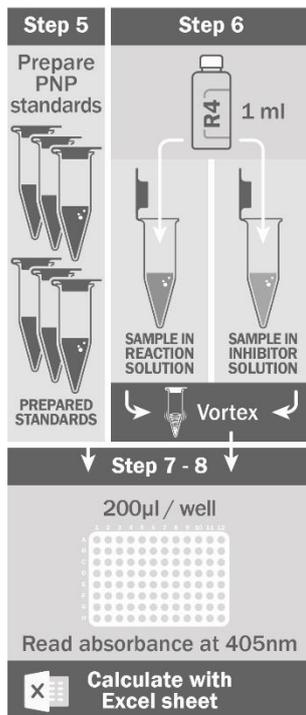
Standard di PNP	Standard da 200 µM	Reagente 6
200 µM	500 µl	0 µl
150 µM	375 µl	125 µl
100 µM	250 µl	250 µl
50 µM	125 µl	375 µl
10 µM	25 µl	475 µl
0 µM (= bianco)	0 µl	500 µl

- Dopo 2 ore di incubazione dei campioni (reazione e inibizione), arrestare la reazione: rimuovere le provette dal blocco termico/bagno d'acqua calda/termoagitatore, aggiungere 1 ml di reagente 4 (tampone di arresto) e agitare con un vortex;
- Pipettare 200 µl di tutti i campioni e degli standard (preparati al passaggio 5) in una piastra per microtitolazione. Eseguire preferibilmente questa operazione in duplicato.
- Leggere l'assorbanza in un fotometro a 405 nm.
- Dopo ogni singolo test, eliminare tutti i reagenti e i materiali utilizzati.

CALCOLO/INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



Scaricare il foglio di calcolo Excel dal nostro sito web e inserire i dati nel foglio per calcolare i risultati.

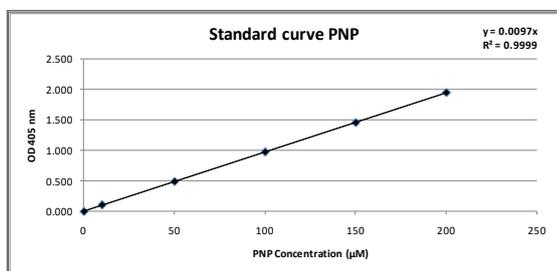


PRINCIPIO:

- Calcolare la media della lettura dei duplicati per ogni standard e campione.
- Sottrarre il valore medio di assorbanza del bianco (standard di PNP da 0 µM) da tutte le letture di standard e campioni. Queste sono le assorbanze corrette per il bianco. **Nei calcoli successivi, utilizzare esclusivamente questi valori corretti per il bianco.**
- Calcolare la curva dello standard di PNP (concentrazioni standard sull'asse X e valori di DO corretti per il bianco sull'asse Y). Eseguire una regressione lineare per calcolare la pendenza. Il coefficiente di determinazione (R^2) deve essere $\geq 0,99$.
- Per ogni campione di reazione: sottrarre il valore di fondo del plasma seminale (= DO_{REAZIONE} corretta per il bianco - $DO_{\text{INIBIZIONE}}$ corrispondente corretta per il bianco). Queste sono le assorbanze corrette per il fondo dei campioni.
- Utilizzare l'equazione della curva di regressione per calcolare la concentrazione di PNP del campione incognito (concentrazione di PNP = valore DO corretto per il fondo / pendenza)
- Calcolare l'attività enzimatica (in mUI/ml) moltiplicando la concentrazione di PNP per 0,479 (ulteriori informazioni su come è stato determinato il "fattore di correzione" sono disponibili nelle Domande frequenti sulla pagina del prodotto del nostro sito web).
- Valori normali per l'alfa glucosidasi neutra nel liquido seminale/plasma seminale umano: $\geq 5,88$ mUI/ml

Esempio

Dati del saggio e curva standard:



Pendenza della curva = 0,0097 (curva dell'equazione: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

$DO_{\text{del bianco}}$ (standard di PNP da 0 µM) = 0,045;

$DO_{\text{REAZIONE}} = 0,845 \rightarrow$ corretta per il bianco: $0,845 - 0,045 = 0,800$
 $DO_{\text{INIBIZIONE}} = 0,060 \rightarrow$ corretta per il bianco: $0,060 - 0,045 = 0,015$
 $DO_{\text{CAMPIONE CORRETTO PER IL FONDO}} = 0,800 - 0,015 = 0,785$

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

Attività enzimatica per ml = $80,93 \mu\text{M} \times 0,479 = 38,76 \text{ mUI/ml}$

LIMITI DEL METODO

EpiScreen Plus è di aiuto nella diagnosi dell'infertilità maschile e, come per altri test biologici, l'interpretazione dei risultati deve essere eseguita nell'ambito dei reperti clinici e dei dati anamnestici. Devono essere escluse altre cause di insufficiente secrezione epididimale, come l'ipoandrogenismo o una grave atrofia testicolare.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Ripetibilità e riproducibilità: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$

Limite di rilevamento: 1,66 mUI/ml

Intervallo di misurazione: 5,02 - 95,8 mUI/ml

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

CONSERVAZIONE/SMALTIMENTO

- EpiScreen Plus è stabile per 24 mesi dalla data di produzione (anche dopo l'apertura).
- Non utilizzare il prodotto dopo la data di scadenza.
- Conservare i reagenti tra 2 °C e 8 °C.
- Non congelare
- Tenere lontano dalla luce (solare).
- Adatto al trasporto o all'esposizione a breve termine a temperature elevate (fino a 5 giorni a 37 °C).
- I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle norme locali per lo smaltimento dei dispositivi medici.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutto il materiale organico umano deve essere considerato potenzialmente infettivo. Maneggiare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere HIV o epatite. Indossare sempre indumenti protettivi quando si maneggiano campioni e reagenti (guanti, camice, protezione per occhi/viso). I reagenti 1, 3 e 5 contengono azoturo di sodio.

Nel caso si verifichi un incidente grave (ai sensi del "regolamento europeo 2017/746 relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*"), occorre segnalarlo a FertiPro NV e, se del caso, all'autorità competente dello Stato membro dell'UE in cui risiede l'utente e/o il paziente.

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, Huisse 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

SUPPORTO TECNICO



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Belgio



EPI_PLUS

GLOSSARIO DEI SIMBOLI

Simboli definiti in ISO 15223			
	Numero di catalogo		Codice del lotto
	Tenere lontano dalla luce (solare)		Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso		Data di scadenza
	Diagnostica in vitro		Limite di temperatura
Simbolo definito nel regolamento IVD 2017/746			
	Marchatura CE da parte dell'organismo notificato 2797		