EPISCREEN PLUS™

Diagnosztikai készlet a semleges alfa-glükozidáz aktivitás meghatározására humán ondóban és ondóplazmában.

Dokumentum azonosító: FP09 I87 R01 C.1

Frissítés: 22/12/2022

In vitro diagnosztikai felhasználásra.
Kizárólag professzionális használatra szánt reagensek.

ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

Az EpiScreen Plus™ segítségül szolgálhat a férfi meddőség diagnosztizálásában és kezelésében. Ez a vizsgálat a semleges alfa-glükozidáz aktivitás meghatározására használható az ondóban (ondóplazmában), amely enzimet főként a mellékhere választja ki[1].

Ennek az enzimnek a működése biztos mutatója a mellékhere működésnek (nagyon) alacsony spermiumkoncentrációjú vagy azoospermiás betegeknél, normál értékű androgénhormon-szint mellett:

- a nagyon alacsony enzimműködés kétoldali elzáródást jelez a mellékhere és az ejakulációs csatorna között[2].
- az alacsony enzimműködés jelentheti a mellékhere részleges elzáródását[2].
- normális enzimműködés akkor várható, ha az enzim kiválasztódási területe felett elzáródás van, vagy nem obstruktív azoospermia (here diszfunkció) esetén[2,3].

RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

Az EpiScreen Plus™ egy félkvantitatív, nem automatizált, fotometrikus és diagnosztikai készlet alkalmazható a semleges alfa-glükozidáz kimutatására emberi ondóban vagy ondóplazmában, és segítségül szolgálhat a férfi meddőség diagnosztizálásában és kezelésében. Egy EpiScreen Plus™ készlet 25 teszt elvégzésére alkalmas.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálati módszer a következő reakción alapul:

PNPG + alfa-glucosidase → alfa-D-glucopyranoside + PNP (sárga)

Meghatározott körülmények (pH = 6.8; T = 37°C) között 1 NE alfa-glükozidáz percenként 1 µmol PNP-t szabadít fel a PNPG[5] szubsztrátumból. A PNP sárga színe 405 nm-en spektrofotometriásan mérhető. Az alfa-glükozidáz aktivitást IU/l (mIU/ml)-ben fejezik ki.

Megjegyzés: A pufferoldat SDS-t tartalmaz, ami szelektíven gátolja a prosztatából származó alfa-glükozidáz savas formáját. Ez lehetővé teszi a semleges enzim működésének specifikus meghatározását[4].

Megjegyzés: Mivel az ondóminták háttérvarianciája meglehetősen nagy (+/- 20%), javasoljuk, hogy minden egyes ondó (-plazma) mintához készítsen negatív kontrollt az inhibitoroldat felhasználásával. Ez az inhibitoroldat glükózt tartalmaz, ami gátolja az alfa-glükozidáz enzim aktivitását[6].

A TESZTHEZ MELLÉKELT ANYAGOK

- Reagens 1 (5ml): reakciópuffer (pH 6,8), kiegészítve 1% SDS-szel
- Reagens 2 (0,25ml): 50x szubsztrátumoldat (PNPG DMSO -ban)
- Reagens 3 (5ml): inhibitoroldat (glükózt tartalmazó reakció puffer)
- Reagens 4 (60ml): a reakciót leállító puffer (0,02M NaOH)
- Reagens 5 (1ml): standard törzsoldat (5mM PNP)
- Reagens 6 (60ml): standard hígítási puffer (0,02M NaOH + 0,1% SDS)

Az analitikai tanúsítvány és az MSDS kérésre rendelkezésre áll, vagy letölthető a weboldalunkról (www.fertipro.com).

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

Lemezolvasó, fotométer (405nm-es szűrővel), fűthető rázógép, vízfürdő vagy blokktermosztát, pipetta új hegyekkel, 1,5 ml-es Eppendorf csövek, mikrotiterlemez.

MÓDSZER

A szemléltető videó megtekintéséhez szkennelje be a vonalkódot (vagy kövesse a www.fertipro.com oldalon található linket.

MINTAVÉTEL

A szabványos spermagyűjtő tartályoknak kell használni, ha a spermát maszturbációval gyűjtik. Ezek jellemzően polipropilénből készülnek, és a sperma túlélési/spermamotilitási vizsgálatot végeznek. Ha a maszturbációval történő ondó-mintavétel nem lehetséges, nem spermicid műanyag óvszereket kell használni.

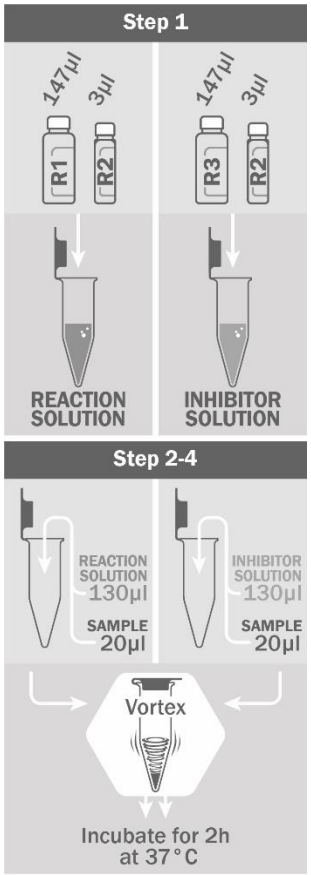
Centrifugálja az ondómintát kb. 3000 g-n 10-15 percig spermiummentes ondóplazma kinyerésére. A vizsgálat friss vagy fagyasztott/kiolvasztott ondó- és ondóplazmamintákon végezhető.

A REAGENS ELŐKÉSZÍTÉSE

Ne használja a terméket, amennyiben a termék kiszállításakor a tárolóedény zárolása felnyílt vagy meghibásodott.
Az 1., 2. és 3. reagenseket 30 percig melegítsük 37 °C-ra (az 1. reagensben előfordulhat kicsapódás, de az előmelegítéssel eltűnik).

MÓDSZER EPISCREEN PLUS

A protokoll és a leírás grafikus megjelenítése:

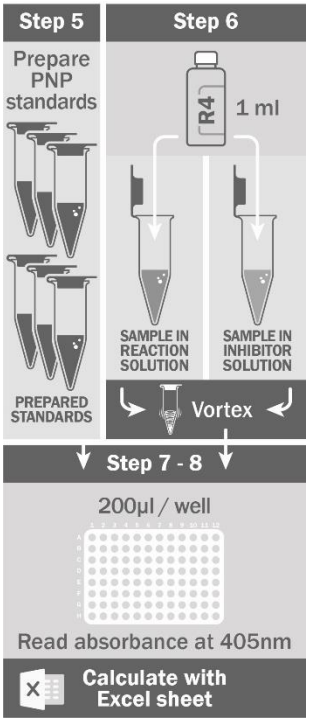


1. Minden egyes vizsgálandó ondó (-plazma) mintához:
   - készítsen reakcióoldatot: 3µl-t a 2. reagensből a 147µl 1. Reagensbe (reakciópuffer)
   - készítsen inhibitoroldatot: 3µl-t a 2. reagensből a 147µl 3. Reagensbe (inhibitoroldat)
2. Pipettázzon 20µl-t minden egyes ondó (-plazma) mintából két 1,5 ml-es Eppendorf csőbe;
3. Töltsön 130 µl reakcióoldatot az egyik reakcióedénybe és 130 µl inhibitoroldatot a másikba (a negatív kontrollhoz);
4. Vortex-ben keverje össze és inkubálja pontosan 2 órán keresztül 37°C-on, hőszabályzott, meleg vizes vízfürdőben, a reakciócsövekhez való fűthető rázógépben vagy blokktermosztátban (kerülje a levegő keringetésű inkubátor használatát, mert ez befolyásolhatja a vizsgálati eredményt!).
5. A ondó (-plazma) minták inkubálása alatt készítse el a PNP-standard görbéhez szükséges oldatokat:
   a. Készítse el a legmagasabb, 200 µm-es standardot: oldjon fel 100 µl-t az 5. reagensből (standard törzsoldat) 2400 µl 6. Reagensben (standard hígítási puffer). Óvatosan keverje össze.
   b. Ezt az oldatot használja a többi standard elkészítéséhez az alábbi táblázatban megadottak szerint. A 6. reagens önmagában 0 µm-es standard PNP-oldatként szolgál (vakminta).

A PNP standard hígításai

PNP standard	200 µM standard	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 (=vakminta)	0 µl	500 µl

6. A minták (reakciómminta és inhibitor minta) 2 órás inkubálása után állítsa le a reakciót: vegye ki a csöveket a blokktermosztátból/melegvizes vízfürdőből/ fűthető rázógépből, adjon hozzá 1 ml-t a 4. Reagensből (a reakciót leállító puffer) és vortexben keverje össze;
7. Pipettázzon 200 µl-t az összes mintából és az (5. lépésben elkészített) standardból egy mikrotiterlemezre. Lehetőleg két példányban végezze el.
8. Fotométeren olvassa le az oldatok abszorbanciáját 405 nm-en.
9. Minden egyes teszt után az összes felhasznált reagenst és anyagot ártalmatlanítani kell.



AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA/ÉRTELMEZÉSE

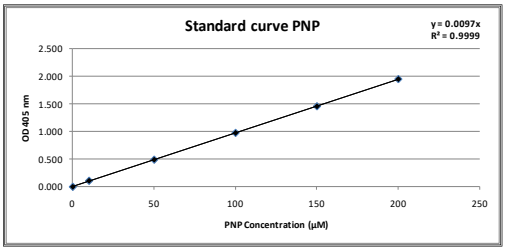
A gyors adatelemzéshez töltse le az Excel számítási táblázatot a weboldalunkról, majd az eredmények kiszámításához vigye be az adatokat a táblázatba.

AZ ELJÁRÁS ELVE:

1. Átlagolja az egyes standardok és minták duplikált mérési eredményeit.
2. Vonja ki a vakoldat (0 µm PNP-standard) abszorbancia-értékének átlagát valamennyi standard mérési értékből. Ezek a vakoldattal korrigált abszorbancia-értékek. A következő számításokban kizárólag ezeket a vakoldattal korrigált értékeket használja.
3. Számítsa ki a PNP-standard görbét (a standard koncentrációk az X tengelyen, és a vakoldattal korrigált OD-értékek az Y tengelyen). A meredekség kiszámításához végezzen lineáris regressziót. A meghatározási együtthatónak (R^2) ≥0,99-nek kell lennie.
4. Minden egyes reakciómintához: vonjuk ki az ondóplazma hátteret ($OD_{REAKCIÓ}$ – megfelelő $OD_{INHIBITOR}$). Ezek a minták háttérkorrigált abszorbanciái.
5. Használja a regressziós görbe egyenletét az ismeretlen minta PNP-koncentrációjának kiszámításához (PNP-koncentráció = háttérkorrigált OD-érték/meredekség).
6. Számítsa ki az enzimaktivitást (mIU/ml-ben) a PNP-koncentráció 0,479-szeresével (további információ a „korrekciós tényező" meghatározási módjáról a honlapunk termékoldalán, a FAQ menüpontban található).
7. A semleges alfa-glükozidáz normál értékei emberi ondóban/ondóplazmában: ≥ 5,88 mIU/ml.

Példa

A vizsgálati adatok és standardgörbe



A görbe meredeksége = 0,0097
(egyenletgörbe: y= 0,0097x), R^2 = 0,9999

$OD_{REAKCIÓ}$ = 0,845 → korrigált: 0,845 – 0,045 = 0,800
$OD_{INHIBITOR}$ = 0,060 → korrigált: 0,060 – 0,045 = 0,015
$OD_{HÁTTÉRKORRIGÁLT\ ABSZORBANCIÁI}$ = 0,800 – 0,015 = 0,785

Koncentrációjav PNP = 0,785 / 0,0097 = 80,93 µM
Enzimaktivitás per ml = 80,93 µM x 0,479 = 38,76 mIU/ml

A MÓDSZER KORLÁTAI

Az EpiScreen Plus vizsgálat a férfi meddőség diagnosztizálása során nyújt segítséget, és mint más biológiai vizsgálatok esetében is, az eredmények értelmezését a klinikai leletek és a kórtörténeti adatok figyelembevételével kell elvégezni. Ki kell zárni az elégtelen mellékhere-szekréció olyan egyéb okait, mint például a hipoandrogenizmus vagy a súlyos heresorvadás.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

Ismételhetőség és reprodukálhatóság: CV_{intra} < 15%, CV_{inter} < 15%

Észlelési határérték: 1,66 mIU/ml

Mérési tartománya: 5,02 -95,8 mIU/ml

Cut-off: ≥ 5,88mIU/ml

TÁROLÁS/ÁRTALMATLANÍTÁS

- EpiScreen Plus a gyártási időponttól számított legalább 24 hónapig megőrzi stabilitását (még felbontás után is).
- Ne használja a termék címkéjén feltüntetett lejárati idő után.
- Tárolás: 2°C és 8°C között.
- Ne fagyassza le.
- Tartsa távol a (nap)fénytől.
- Alkalmas magas hőmérsékleten történő szállításra vagy rövid időtartamú tárolásra (legfeljebb 5 napig 37°C-on).
- A reagenst az orvostechnikai eszközök ártalmatlanítására vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

Minden emberi eredetű, szerves anyagot potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni. Minden mintával úgy kell bánni, mint ami alkalmas lehet a HIV vagy a hepatitis továbbadására. A mintá és reagensek kezelése során mindig viseljen védőruházatot (kesztyű, laboratóriumi mellény, szem- és arcvédő). Az 1., 3. és 5. reagens nátrium-azidot tartalmaz.

Minden bekövetkezett súlyos eseményt (a 2017/746 európai in vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközrendelet meghatározása szerint) jelenteni kell a FertiPro NV-nek és adott esetben annak az uniós tagállam illetékes hatóságának, ahol a felhasználó és/vagy a beteg lakóhelye található.

HIVATKOZÁSOK

1. 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
2. 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
3. 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.
4. 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
5. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021
6. Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α-glucosidase. Biochim. Biophys. Acta, 1645: 22-29

ÜGYFÉL-MŰSZAKI TÁMOGATÁS

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

CE 2797

IVD

REF EPI_PLUS

Az ISO 15223-1 szabványban meghatározott szimbólumok			
REF	Katalógus-szám	LOT	Tételkód
	Napfénytől távol tartandó		Gyártó
	Lásd a használati utasítást		Felhasználhatósági idő
IVD	In Vitro diagnosztika	°C °C	Hőmérsékleti határérték
Az dokumentumában meghatározott szimbólum IVDR 2017/745			
CE 2797	CE-jelölés a bejelentett szervezet által 2797		