

EpiScreen Plus

Test auf α -Glukosidase Aktivität im Seminalplasma

Bestellnr.: 3011

- für 25 Anwendungen
- CE-gekennzeichnet



Inhalt:

- Reagenz 1:** 5 ml Pufferlösung, enthält SDS
Reagenz 2: 0,15 ml Substratlösung PNPG 50fach
Reagenz 3: 5 ml Inhibitorlösung, enthält Glukose und SDS
Reagenz 4: 60 ml Stopp-Lösung, enthält NaOH
Reagenz 5: 1 ml Standard 5mM PNP
Reagenz 6: 60 ml Standard-Verdünnungslösung, enthält NaOH und SDS

Lagerung:

Gekühlt bei 2°C bis 8°C lagern.

Haltbarkeit:

24 Monate ab Herstellungsdatum.

Hinweis:

Für jede Charge ist ein Analysenzertifikat unter www.fertipro.com erhältlich.

FertiKult Gück GmbH
Zietenstraße 25a
10783 Berlin

Tel. 030 - 21 47 37 38
Fax 030 - 21 47 37 39

office@fertikult.de
www.fertikult.de



Anwendungsbereich:

Das Seminalplasma enthält verschiedene Sekretionsprodukte der Nebenhoden, wobei die Konzentration der neutralen α -Glukosidase der empfindlichste Marker für die Funktionsfähigkeit der Nebenhoden ist. Eine sehr geringe α -Glukosidase-Aktivität tritt bei Patienten mit Azoospermie als Folge eines doppelseitigen Verschlusses zwischen den Nebenhoden und den Samenleitern auf. Ist die Azoospermie dagegen auf eine Hemmung der Spermienreifung, einen Verschluss des Hodennetzes oder einen Verschluss zwischen dem Hodennetz und den Nebenhoden zurückzuführen, sind die α -Glukosidase-Werte im Seminalplasma normal (~20mIU/Ejakulat bzw. 6.35mIU/ml). Daher erlaubt die Durchführung des EpiScreenPlus-Tests bei normal virilen Männern mit Azoospermie eine Differenzierung zwischen den Hauptgründen dieser Störung, ohne eine Hodenbiopsie zu erfordern.

Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Bestimmung der neutralen α -Glukosidase-Aktivität im Seminalplasma bei Patienten mit Oligozoospermie einen partiellen Verschluss der Nebenhoden widerspiegeln kann, hervorgerufen durch Infektionen oder entzündliche Prozesse. Bei Patienten mit normaler Spermienkonzentration korrelieren die Ergebnisse von α -Glukosidase-Test und Shorr-Anfärbung, bei der durch Nebenhodensekretion verursachte Veränderungen in der Spermamembran widergespiegelt werden.

Neuerungen:

Gegenüber dem Testkit *EpiScreen* benötigen Sie mit *EpiScreenPlus* 2 Stunden weniger Inkubationszeit. Mit den mitgelieferten Standard-Lösungen erstellen Sie bei jedem Ansatz eine Standardkurve, was die Richtigkeit des Ergebnisses erhöht und das Ergebnis reproduzierbar macht. Das Probenvolumen ist auf 20 μ l reduziert worden.

Wie von der WHO gefordert, wird mit *EpiScreenPlus* nur die Aktivität der **neutralen** α -Glukosidase erfasst - mit *EpiScreen* wurde die Aktivität der sauren α -Glukosidase mitgemessen.

Für weitere Informationen beachten Sie bitte den Beipackzettel.



Gebrauchsanleitung:

Testprinzip:

4-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid (PNPG) wird durch α -Glukosidase zu 4-Nitrophenol (gelb) und α -D-Glukopyranosid umgesetzt.

Das SDS im Reaktionspuffer inhibiert selektiv die Aktivität der sauren α -Glukosidase. Mit EpiScreen Plus bestimmen Sie daher spezifisch die Aktivität des neutralen Enzyms.

Testempfindlichkeit:

Obere und untere Nachweisgrenze für α -Glukosidase: 2,32 bis 144 mIU/ml

Sensitivität: >95%

Spezifität: >90%

Abweichung: <5%

Durchführung:

1. Stellen Sie die Reaktionslösung her: Für jede zu analysierende Probe vermischen Sie bitte dazu 3 μ l Reagenz 2 in 147 μ l Reagenz 1.
2. Stellen Sie die Inhibitorlösung mit Glucose her: Für jede zu analysierende Probe vermischen Sie bitte dazu 3 μ l Reagenz 2 in 147 μ l Reagenz 3.
3. Pipettieren Sie je 20 μ l Sperma (frisch oder aufgetaut) bzw. Seminalplasma in 2 1,5ml Eppendorfröhrchen.
4. Fügen Sie zu dem einen Röhrchen mit der Probe 130 μ l der unter 1.) hergestellten Reaktionslösung (Probe) und zu dem anderen Röhrchen 130 μ l der unter 2.) hergestellten Inhibitorlösung (Probe + Glukose) zu. Vortexen Sie und inkubieren Sie die Proben 2 Stunden bei 37°C.
5. Während der Inkubation erstellen Sie die PNP-Standardlösungen: Stellen Sie den 200 μ M-Standard durch Lösen von 100 μ l Reagenz 5 in 2400 μ l Reagenz 6 her.
Hieraus stellen Sie je 500 μ l weitere Standardlösungen mit den Konzentrationen 150 μ M, 100 μ M, 50 μ M und 10 μ M. 500 μ l Reagenz 6 dienen als Nullstandard (0 μ M).
6. Nach 2 Stunden Inkubation der Proben stoppen Sie die Reaktion durch Zufügen von jeweils 1ml Reagenz 4 in beide Eppendorfröhrchen. Vortexen Sie die Proben erneut. Zu den Standard-Lösungen wird kein Reagenz 4 gegeben!
7. Pipettieren Sie je 200 μ l aller PNP-Standards und Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte und ermitteln Sie die Extinktionen bei 405nm.

Standardkurve:

Ziehen Sie den Extinktionswert des Nullstandards jeweils von den Extinktionen der PNP-Standardlösungen ab. Tragen Sie diese Differenz über den Standard-Konzentrationen graphisch auf und ermitteln Sie über lineare Regression eine Ausgleichsgerade mit einem Regressionskoeffizienten von mindestens 0,99.



Ergebnis:

Von den Extinktionswerten jeder Probe ziehen Sie zunächst den Extinktionswert des Nullstandards ab, um die bereinigten Extinktionen zu erhalten. Sodann ermitteln Sie die Differenz zwischen den bereinigten Extinktionen der Lösungen "Probe" und "Probe + Glukose" jeweils eines Patienten. Über die Ausgleichsgerade der PNP-Standards berechnen Sie die PNP-Konzentration der Proben in μM z.B. über Teilen der Differenz durch die Steigung der Standardkurve.

Die Enzymaktivität in mIU/ml ist dann der Wert der Konzentration multipliziert mit 0,479.

Beispiel:

$$\begin{aligned} 1. E'_{\text{Probe}} &= E_{\text{Probe}} - E_{\text{Nullstandard}} \\ E'_{\text{Probe+Glukose}} &= E_{\text{Probe+Glukose}} - E_{\text{Nullstandard}} \\ 2. C_{\text{Probe}} &= (E'_{\text{Probe}} - E'_{\text{Probe+Glukose}}) / \text{Steigung}_{\text{Ausgleichsgerade}} \\ 3. \text{Enzymaktivität} &= C_{\text{Probe}} * 0,479 \text{ mIU}/(\text{ml} * \mu\text{M}) \end{aligned}$$

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des Ejakulats multiplizieren Sie den letzten Wert einfach mit dem Ejakulatvolumen.

Eine Aktivität von mindestens 19,98mIU/Ejakulat bzw. 6.35mIU/ml wird als normal angenommen (WHO 2012).

Ergebnisbewertung:

Die Interpretation der Ergebnisse muss unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und der Patientenanamnese erfolgen. Andere Gründe für eine niedrige epididymale Sekretion wie ein Hypoandrogenismus oder eine schwere testikuläre Atrophie sind ebenfalls abzuklären.

Sicherheitshinweise/Vorsichtsmaßnahmen:

Reagenz 1 und 3 enthält Natriumdodecylsulfat (SDS) . Bei Berührung mit Augen mit Wasser ausspülen. Kontaktlinsen wenn möglich entfernen und weiter mit Wasser ausspülen.

Reagenz 4 und 6 enthält NaOH. Ätzend. Bei Berührung mit Augen mit Wasser ausspülen und Arzt konsultieren. Schutzbrille und Schutzkleidung tragen. Im Falle eines Unfalls sofort Arzt aufsuchen.

