

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К
СПЕРМАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ В СЫВОРОТКЕ

EIA-1826, Sperm Antibody ELISA

Каталог. № : **EIA-1826**
Количество : **96**
Производитель: **DRG (Германия)**

Методика от **11-2015**
Версия **17.0**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Антиспермальные антитела ELISA компании DRG – это надежный количественный анализ для определения антител к сперматозоидам человека. Материалом исследования является сыворотка.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Антитела к антигенам сперматозоидов могут приводить к бесплодию у мужчин и женщин. Применение тест-системы ф. ДРГ для определения антиспермальных антител рекомендуется для диагностики иммунологических нарушений фертильности.

Нежелательное бесплодие становится серьезной проблемой, с которой сталкиваются до 20 % супружеских пар репродуктивного возраста. В 20% случаев присутствие антиспермальных антител у пациентов обоих полов определяемо. (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Бесплодием, согласно ВОЗ (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999) называется отсутствие зачатия в течение 12 месяцев регулярных незащищенных половых контактов. Основной причиной иммунологических нарушений фертильности является выработка антител к антигенам сперматозоидов.

Антиспермальные антитела оказывают гетерогенное влияние на способность спермы к оплодотворению. Широко известен ингибирующий эффект антиспермальных антител на подвижность сперматозоидов за счет связывания с их поверхностью и агглютинирующих процессов. (Zouari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

Взаимодействие сперматозоида и яйцеклетки и последующее связывание и проникновение в желточную оболочку ооцита может ингибироваться антиспермальными антителами. Последующие слияние яйцеклетки и сперматозоида так же может быть ослаблено присутствием антиспермальных антител (Mazumdar S et al.: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

Согласно Crosignani et al. (Crosignani et al.: PG et al.: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) процент беременностей у пар, где женщина или мужчина имеет антиспермальные антитела на 38% ниже по сравнению с контрольными группами. Более того, влияние на имплантацию и на раннее развитие плода так же можно подтвердить. Ассоциации антиспермальных антител с невынашиваемостью так же обсуждаются.

Частота случаев наличия антиспермальных антител у бесплодных пар доходит до 20% (Lahteenmaki A et al.: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al.: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Антиспермальные антитела могут присутствовать растворенными в эякуляте или на поверхности сперматозоидов. Антиспермальные антитела могут быть обнаружены у женщин и у мужчин (Clarke GN et al.: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). У женщин антиспермальные антитела могут быть находиться в шейной слизи, в жидкости яйцевода или фолликулярной жидкости. Мужчины, у которых более 50 % сперматозоидов покрыты антиспермальными антителами, имеют заметно более низкую фертильность. (Abshagen K et al.: Fertil Steril (1998) 70, 355-6).

3. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

ELISA набор ДРГ для определения антиспермальных антител может применяться в клинической практике для диагностики иммуногенного бесплодия у мужчин и женщин.

4. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор для определения антиспермальных антител ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) – это твердофазный иммуноферментный анализ для количественного определения антиспермальных антител в сыворотке человека, основанный на принципе «сэндвича»

Микропланшет покрыт смесью спермальных протеинов, распознаваемых антиспермальными антителами. Образцы и стандарты пипетируются в лунки и инкубируются. Во время инкубации антиспермальные антитела связываются со спермальными протеинами и таким образом фиксируются на плашке. После промывки добавляется ферментный конъюгат, состоящий из поликлональных антител к антигенным детерминантам спермальных белков, ковалентно связанных с пероксидазой хрена. После промывания несвязанного конъюгата окисляется добавляемым раствором ТМБ, что дает цветовую реакцию, которая прекращается добавлением стоп-раствора. Поглощение измеряется при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере. Рекомендуется провести сравнительное измерение на длине волны >550 нм.

5. РЕАГЕНТЫ

для 96 измерений

	Реагенты	кол-во
1.	Микротитровальные лунки, покрытые антигеном спермы	96 лунок
2.	Набор стандартов антиспермальных антител ELISA – Стандарт 1 (31 Ед/мл – бесцветный колпачок) – Стандарт 2 (62 Ед/мл – белый колпачок) – Стандарт 3 (125 Ед/мл – желтый колпачок) – Стандарт 4 (250 Ед/мл – синий колпачок)	0.5 мл/флакон
3.	Контроль (зеленый колпачок)	0.5 мл
4.	Буфер для разведения (так же используется как бланк- реагент/нулевой стандарт/0 Ед/мл)	2 x 50 мл
5.	Промывочный раствор (10x)	50 мл
6.	Ферментный конъюгат (готовый к использованию)	8 мл
7.	Раствор субстрата (ТМБ, готовый к использованию)	13 мл
8.	Стоп раствор (0.25 моль/л H ₂ SO ₄)	13 мл
9.	Держатель для отдельных стрипов	1 x

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм, опционально с референтным фильтром ≥ 550 нм.
2. Микротитровальные пипетки со съёмными наконечниками: 5 мкл, 50 мкл и 500 мкл.

3. Пробирки для разведения образцов.
4. Дистиллированная или деионизированная вода.
5. Абсорбирующая бумага.
6. Использовать только калиброванные пипетки и инструменты.

7. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Данный набор предназначен только для диагностики in-vitro.
2. Избегать контакта со Стоп-раствором. Он может вызвать ожоги и раздражение кожи.
3. Не пипетируйте ртом.
4. Обращаться со всеми реагентами, как с потенциально инфицированными, т.е. с предельной осторожностью.
5. При работе следуйте национальным правилам и требованиям по безопасности.

8. ИНСТРУКЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ РЕАГЕНТОВ

1. Не использовать реагенты из разных наборов.
2. Довести все реагенты до комнатной температуры перед использованием.
3. Перемешивать все реагенты, избегая вспенивания.
4. После начала анализа все этапы должны проводиться без перерыва.
5. Пипетировать все реагенты на дно лунки. Шейкирование и перемешивание реагентов после пипетирования не требуется.
6. Для каждого образца использовать новый наконечник.
7. Перед началом исследования рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, закрепить необходимое количество стрипов в держателе, и т.д. Это обеспечит равные промежутки времени для каждого этапа пипетирования.
8. Для оптимального результата необходимо тщательно промывать лунки после инкубации, удаляя остатки содержимого лунок ПОЛНОСТЬЮ.
9. Оптимальная температура в рабочем помещении должна составлять 20 °C – 22 °C.
10. Для снижения ошибочности результатов рекомендуется проводить исследование в дублях.

9. УКАЗАНИЯ ПО ХРАНЕНИЮ И СРОКИ ГОДНОСТИ

1. Хранить реагенты при 2 °C – 8 °C.
2. Реагенты стабильны до даты срока годности
3. Разбавленный моющий раствор стабильный 4 недели при температуре 4-8 °C.
4. Сразу после использования плотно закрывать флаконы с реагентами.
5. Хранить микротитровальные стрипы в герметичной упаковке с влагопоглотителем. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытой упаковке с влагопоглотителем. при соблюдении условий хранения стрипы стабильны по меньшей мере 4 недели после вскрытия упаковки.

10. ОБРАЗЦЫ Сыворотка

11. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Забрать кровь венопункцией, дать свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре; Избегайте гемолиза. Не допускайте повторного замораживания и размораживания. Храните пробирки тщательно закрытыми, поскольку возможно загрязнение или изменение концентрации.

1. При работе с образцами соблюдать осторожность, т.к. они могут быть инфицированы.
2. Не известно влияние внешних факторов или других веществ.
3. Образцы можно хранить при различной температуре:
 - при температуре до 30 °C: до трех дней
 - в холодильнике (2– 8 °C): до 1 недели
 - в бытовом морозильнике (-10 °C – -20 °C): до 1 года

Внимание!!!

Не существует методов тестирования, которые гарантировали бы, что образцы и реагенты не содержат вируса Гепатита В, ВИЧ (HIV/HTLV-III/LAV) и других возбудителей инфекционных заболеваний. Поэтому все продукты крови и пробы пациентов нужно рассматривать как потенциально инфицированные.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Довести все реагенты до комнатной температуры и тщательно перемешать.
2. Приготовление промывочного раствора (10x): развести концентрированный промывочный раствор (50 мл) добавив 450 мл дистиллированной или деионизированной воды. **Внимание:** не использовать неочищенную водопроводную воду!
3. Развести сыворотки 1: 100 буфером для разведения (разведение 1:100: 5 мкл сыворотки + 495 мкл буфера).
4. Установить необходимое количество лунок в держатель.
5. Добавить 50 мкл стандартов в соответствующие лунки.
6. Добавить 50 мкл разведенной сыворотки (используя новые наконечники) в соответствующие лунки.
7. Инкубировать 60 минут при 37 °C. Рекомендуется использование увлажнительной камеры.
8. Резко вытряхнуть содержимое лунок и промыть лунки три раза 200 мкл разведенного промывочного раствора.
9. Вытряхнуть остатки воды из лунок, постучав (в держателе) по поверхности, покрытой впитывающей бумагой или тканью.
10. Внести 50 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
11. Инкубировать 60 минут 37 °C. Рекомендуется использование увлажнительной камеры.
12. Резко вытряхнуть содержимое лунок и промыть лунки три раза 200 мкл разведенного промывочного раствора.
13. Вытряхнуть остатки воды из лунок, постучав (в держателе) по поверхности, покрытой впитывающей бумагой или тканью.
14. Внести 50 мкл раствора субстрата в каждую лунку сразу после промывки.
15. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
16. Остановить ферментативную реакцию добавлением 50 мкл стоп раствора в каждую лунку в той же последовательности, в которой добавлялся субстрат.
17. Измерить поглощение образцов при 450 нм не позднее чем через 10 минут после остановки реакции.

Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре. Это делает возможной интерполяцию при фиксированных физико-химических условиях.

Т.к. калибраторы исследуются при каждой постановке, отклонения поглощения не влияют на правильность результата. В любом случае, рекомендуется использовать дополнительный внутренний контроль.

Схема пипетирования для ELISA набора для определения антиспермальных антител

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	БЛАНК	БЛАНК	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35
B	S	1	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36
C	S	2	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37
D	S	3	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38
E	S	4	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39
F	P	C	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40
G	P	1	P	9	P	17	P	25	P	33	P	41
H	P	2	P	10	P	18	P	26	P	34	P	42

В этой схеме рекомендуемые позиции для бланков (использовать буфер для разведения образцов, входящий в набор), стандарты (S1 – S4), положительный контроли (PC) и образцы пациентов (P1 – P42) показаны в дублях.

13. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Подсчитать средние значения абсорбции для каждого комплекта стандартов, контролей и образцов пациентов.
2. ОП каждого стандарта отображается на графике как значение Y (на оси Y), а соответствующие значения уровней антиспермальных антител – как значения X (на оси X). Полученная калибровочная кривая используется для определения значений образцов пациентов. Значения ОП образцов сывороток соотносят с соответствующими концентрациями антиспермальных антител интерполяцией.
3. Используя среднее значение абсорбции для каждого образца определить концентрации антиспермальных антител в Ед/мл по стандартной кривой.

14. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- При температурах выше 30 °C (86 °F) образцы должны транспортироваться охлажденными. Время остановки (ферментативной цветовой) реакции, возможно, потребуется сократить.
- Не использовать сильно гемолизированные или липемичные сыворотки, а так же сыворотки пациентов с заболеваниями печени. Результаты могут измениться под влиянием определенных патологических условий, напр., поли- и моноклональных гаммапатий, аутоиммунных заболеваний или при измененном иммунном статусе.

15. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные значения: 0 – 60 Ед/мл
 Завышенные значения: выше 60 Ед/мл
 Если значение в пределах около значения cut-off (55 ÷ 65 Ед/мл), рекомендуется дополнительное измерение с использованием нового образца, забранного в течение 2 недель.

16. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. **Коэффициент вариации в анализе:** 6,88% (5,90 – 7,81 %)

Для определения коэффициента внутренней вариации использовались 6 наборов 6 различных партий (с разными датами производства). Один образец пациента использовался 96 раз (ОП= 1,0) за 1 постановку.
2. **Коэффициент вариации между анализами:** 6,45% (4,84 – 7,52 %)

Для определения коэффициента внешней вариации использовалось по 1 стрипу из 12 наборов из шести различных партий (с разными датами производства). Один образец пациента использовался 72 раза (ОП= 1,0) за 1 постановку.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
 ул. Чорновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com