



Иммуноферментный анализ для измерения антител к спермальным антигенам в семенной плазме

Sperm Antibody ELISA (seminal plasma)

Кат. № : EIA-4249
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

МЕТОДИКА 01-2005
Версия 2.0

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

1 НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

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

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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 глобулинов к антигенам человека, ковалентно связанных с пероксидазой хрена. После вымывки несвязанного конъюгата окисляется добавляемым раствором ТМБ, что дает цветовую реакцию, которая прекращается добавлением стоп-раствора. Поглощение измеряется при длине волны 450 nm на микропланшетном ридере. Рекомендуется провести сравнительное измерение на длине волны >550 nm.

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

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1 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. Обращаться со всеми реагентами как с потенциально инфицированными, т.е. с предельной осторожностью.

3.2 Инструкции по приготовлению 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.

4 РЕАГЕНТЫ

На 96 определений

Реагенты	Кол-во	Приготовление
Микротитрационные лунки покрытые антигеном спермы	96 лунок	
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 – голубой колпачок)	0.5 мл/флакон	готов использованию к
Контроли (зеленый колпачок) на 100-200 U/ml	0.5 мл	готов использованию к
Буфер для разбавления (так же используется как бланк- реагент / нулевой стандарт / 0 ед/мл)	50 мл	готов использованию к
Промывочный раствор (10x)	50 мл	концентрированный
Ферментный конъюгат	8 мл	готов использованию к
Раствор субстрата (ТМВ)	13 мл	готов использованию к
Стоп раствор (0.25 моль/л H ₂ SO ₄)	12 мл	готов использованию к
Держатель для отдельных стрипов	1 х	
Связывающее покрытие	2 х	

4.1 ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

1. Хранить реагенты при 2°C – 8°C (36 °F – 46 °F).
2. Реагенты стабильны до даты срока годности
3. Сразу после использования плотно закрывать флаконы с реагентами.
4. 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.

5 НЕОБХОДИМЫЕ НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм, выборочно с контрольным фильтром >550 нм.
2. Микротитрационные пипетки со съемными наконечниками: 5 мкл, 50 мкл and 500 мкл.
3. Пробирки для разбавления образцов.
4. Дистиллированная или деионизированная вода.
5. Абсорбирующая бумага.
6. Использовать только калибровочные пипетки и инструменты.

6 МАТЕРИАЛ ОБРАЗЦА

Семенная плазма

6.1 Забор и подготовка образцов

Отобрать свежий эякулят, отцентрифугировать при комнатной температуре и отделить поверхностный слой (семенную плазму). Избегать многократного замораживания семенной плазмы. Хранить пробирки закрытыми во избежание контаминации или изменения концентрации.

1. При работе с образцами соблюдать необходимые меры предосторожности, т.к. они могут быть инфицированы.
2. Влияние внешних факторов не выявлено.
3. Образцы хранятся при различных температурах определенные периоды времени:
 - 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.

7 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Довести все реагенты до комнатной температуры и тщательно перемешать.
2. Приготовление промывочного раствора (10х): развести концентрированный промывочный раствор (50 мл) добавив 450 мл дистиллированной или деионизированной воды. Разведенный промывочный раствор стабилен 4 недели при температуре (4 °C – 8 °C / 39 °F – 46 °F). **Внимание:** не использовать неочищенную водопроводную воду!
3. Развести эякуляты 1: 5 (1+4) буфером для разведения (разведение: 100 мкл эякулята + 400 мкл буфера).
4. Установить необходимое количество лунок в держатель.
5. Добавить по 50 мкл стандартов в соответствующие лунки.
6. Добавить по 50 мкл разведенной семенной плазмы (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. Раскапать по 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. Раскапать по 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 в не позднее чем через 10 минут после остановки реакции.

Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре. Это делает возможной интерполяцию при постоянных 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.

7.1 Схема пипетирования

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	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.

8 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 U/ml по стандартной кривой.

9 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

При температурах выше 30 °C (86 °F) образцы должны транспортироваться охлажденными. Время остановки (ферментативной цветовой) реакции, возможно, потребует сократиться.

10 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

нормальные значения: 0 – 60 ед/мл

повышенные значения: свыше 60 ед/мл

В случае попадания значения в диапазон cut-off (от 55 до 65 ед/мл) рекомендуется провести повторное исследование на новом образце, отобранном в течение следующих 2-х недель.

11 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. **коэффициент внутренней вариации:** 6,44% (5,69 – 7,92%)

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 внешней вариации:** 7,15% (6,04 – 8,21)

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.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Черновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: +38 (0342) 77 51 22
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com