

НАБІР РЕАГЕНТІВ СПЕРМАЛЬНІ АНТИТІЛА ELISA

Sperm Antibody ELISA

Кат. №: EIA-1826

Дата випуску інструкції: 2019/08
Версія 18.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1. НАЙМЕНУВАННЯ І ПРИЗНАЧЕННЯ

Антиспермальні антитіла ELISA – це надійний кількісний тест для визначення антитіл до сперматозоїдів людини. Матеріалом для дослідження є сироватка.

Примітка: терміни "антисперматозоїдні антитіла" "антиспермальні антитіла" та "сперматозоїдні антитіла" еквівалентні. У цих інструкціях використовується досить важкий, але правильний термін "антисперматозоїдні антитіла".

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Антитіла спрямовані проти сперматозоїдних антигенів можуть викликати безплідність у жінок або у чоловіків. Застосування набору ІФА для визначення антисперматозоїдних антитіл рекомендується для діагностики імунологічних порушень фертильності.

Небажане безпліддя стає серйозною проблемою, з якою стикаються до 20% подружніх пар репродуктивного віку. У 20% таких випадків присутність антисперматозоїдних антитіл у пацієнтів обидвох статей можна виявити. (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Безпліддям, згідно ВООЗ (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999), називається відсутність зачаття протягом 12 місяців регулярних незахищених статевих актів. Основною причиною імунологічних порушень фертильності є утворення антитіл до антигенів сперматозоїдів.

Антисперматозоїдні антитіла чинять гетерогенний вплив на здатність сперматозоїдів до запліднення. Широко відомий інгібуючий вплив антисперматозоїдних антитіл на рухливість сперматозоїдів шляхом зв'язування їх з поверхнею та шляхом процесу аглютинації (Zouari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

Проникнення сперматозоїдів у цервікальну слизову порушується наявністю антисперматозоїдних антитіл у насінній плазмі та/або в слизовій шийки матки (Eggert-Kruse W et al: Hum Reprod (1993) 8, 1025-31). Антитіла до сперматозоїдів негативно впливають на конденсацію та акросомну реакцію сперматозоїдів, і тим самим перешкоджають взаємодії сперматозоїдів з ооцитом (Francavilla F et al: Front Biosci (1999): 1; 4: 9-25; Bohring C et al.: Hum Reprod (2001) 7: 113-8).

Взаємодія сперматозоїда з яйцеклітиною та подальше зв'язування та проникнення в зону пелюциди може інгібуватися антисперматозоїдними антитілами. Наступне злиття яйцеклітини та сперматозоїда може бути послаблене наявністю антисперматозоїдних антитіл (Mazumdar S et al.: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kuttah WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

Відповідно до Crosignani et al. (Crosignani et al.: PG et al.: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) відсоток вагітностей у пар, де жінка або чоловік має антисперматозоїдні антитіла на 38% нижче порівняно з контрольними групами. Крім того, можна також підтвердити вплив на імплантацію та на ранній розвиток плоду. Також обговорюється зв'язок антисперматозоїдних антитіл з невиношуванням.

Частота наявності антисперматозоїдних антитіл у безплідних пар становить 20% (Lahteenmaki A et al.: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al.: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Антисперматозоїдні антитіла можуть бути присутні у еякулянті або на поверхні сперматозоїдів. Антисперматозоїдні антитіла можуть бути як у жінок, так і в чоловіків (Clarke GN et al.: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). У жінок, антисперматозоїдні антитіла можуть бути у цервікальній слизі, рідині яйцеводу та фолікулярній рідині. Чоловіки, у яких більше 50% сперматозоїдів покриті антисперматозоїдними антитілами, мають помітно нижчу фертильність. (Abshagen K et al.: Fertil Steril (1998) 70, 355-6).

3. ОБЛАСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Даний набір є частиною клінічної практики для діагностики імунологічного безпліддя у жінок та чоловіків.

4. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір для визначення антисперматозоїдних антитіл ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) – це твердофазний імуоферментний аналіз, для кількісного визначення антисперматозоїдних антитіл у людській сироватці, за принципом «сендвіч».

Планшет покритий сумішшю сперматозоїдних протеїнів, які розпізнаються антисперматозоїдними антитілами. Зразки та стандарти піпетують у лунки, а потім інкубують. Під час інкубації антисперматозоїдні антитіла зв'язуються зі сперматозоїдними протеїнами і таким чином фіксуються на плащі. Після промивання, додається ферментний кон'югат, який складається з антитіл до людського глобуліну ковалентно зв'язаних з пероксидазою хрому. Після видалення незв'язаного кон'югату шляхом промивання, пероксидаза хрому окислюється доданим розчином ТМБ (3,3', 5,5'- тетраметилбензидин), що викликає кольорову реакцію, яку можна зупинити, додавши 0,25 М сірчаної кислоти (H₂SO₄). Поглинання вимірюється при довжині хвилі 450 нм на мікропланшетному зчитувачі. Рекомендується провести референсне вимірювання з довжиною хвилі ≥550 нм.

5. РЕАГЕНТИ

(Для 96 вимірювань)

1.	Мікротитрові лунки , покриті антигеном сперми	96 лунок
2.	Набір стандартів антиспермальних антитіл ELISA	
-	Стандарт 1 (31 О/мл – безбарвна кришечка)	
-	Стандарт 2 (62 О/мл – біла кришечка)	
-	Стандарт 3 (125 О/мл) – жовта кришечка)	0.5 мл / флакон
-	Стандарт 4 (250 О/мл) - синя кришечка)	
3.	Контроль (зелена кришечка)	0.5 мл
4.	Буфер для розведення (також використовується як бланк / нульовий стандарт/ 0 О/мл)	2 x 50 мл
5.	Промивний розчин (10x концентрований)	50 мл
6.	Ферментний кон'югат (готовий до використання)	8 мл
7.	Розчин субстрату (ТМБ, готовий до використання)	13 мл
8.	Стоп-розчин (0.25 моль/л H ₂ SO ₄)	13 мл
9.	Тримач для окремих стріпів	1 x

6. ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

- Мікропланшетний рідер з фільтром 450 нм, опційно з референсним фільтром ≥ 550 нм.
- Мікротитрувальні піпетки з одноразовими наконечниками: 5мкл, 50 мкл та 500 мкл.
- Пробірки для розведення зразків.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Абсорбуючий папір.
- Використовувати тільки калібровані піпетки та прилади.

7. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Цей набір призначений тільки для діагностики *in vitro*.
- Уникайте контакту зі стоп-розчином. Він може викликати подразнення шкіри та опіки.
- Не піпетувати реагенти ротом.
- Поводитися з реагентами як з потенційно інфекційними та обробляти з максимальною обережністю.
- Обробляти та використовувати слід відповідно до процедур, визначених національними правилами та вимогами щодо безпеки.

8. ІНСТРУКЦІЇ ЩОДО ПІДГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

- Не використовуйте реагенти із різних наборів.
- Перед використанням, всі реагенти та зразки довести до кімнатної температури.
- Перемішати всі реагенти, уникаючи спінювання.
- Після початку аналізу, всі етапи слід проводити не перериваючи процесу.
- Піпетувати всі реагенти та зразки на дно лунки. Не рекомендується змішувати або струшувати реагенти після піпетування.
- Для кожного зразка використовуйте новий наконечник.
- Перед початком тестування, всі реагенти потрібно підготувати, зняти кришечки, закріпити необхідну кількість стріпів на тримачі, і т. д. це забезпечить рівні проміжки часу для кожного етапу піпетування.
- Для оптимальних результатів, важливо, ретельно промити лунки після інкубації та видалити залишки води, стукаючи плашкою по

- абсорбуючому папері або тканині.
- Оскільки, кінетика ферментативної реакції залежить від температури навколишнього середовища, то слід дотримуватися різної кімнатної температури. Оптимальна температура в робочому приміщенні повинна бути 20 - 22°C (68°F - 72°F).
 - Щоб знизити ймовірність отримання помилкового результату, рекомендується проводити тестування в дублікатах.

9. ВКАЗІВКИ ЩОДО ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

- Зберігати реагенти при температурі 2°C - 8°C (36°F - 46°F).
- Реагенти залишаються стабільними до дати терміну придатності.
- Розведений миючий розчин стабільний 4 тижні при температурі (4°C - 8°C / 39°F - 46°F).
- Після використання, негайно щільно закривайте флакони кришечками.
- Зберігати мікротитрові стрипи у герметичній упаковці з осушувачем. Стрипи, які залишилися слід зберігати у щільно закритій упаковці разом з осушувачем. При дотриманні умов зберігання, стрипи стабільні щонайменше 4 тижні після відкриття упаковки.

10. ЗРАЗКИ

Сироватка

11. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зробити забір, шляхом венепункції, дати згорнутися, відділити сироватку шляхом центрифугування при кімнатній температурі; уникати гемолізу. Не допускати повторного заморожування та розморожування. Зберігати пробірки щільно закритими, оскільки існує ймовірність забруднення або зміни концентрації.

- Під час обробки зразків слід дотримуватися максимальної обережності, тому що вони можуть бути інфекційними.
- Відсутній вплив зовнішніх факторів та інших речовин.
- Зразки можна зберігати при різній температурі протягом наступних проміжків часу:
 - При температурі при температурі до 30°C (86°F): до 3 днів
 - В холодильнику (2°C - 8°C / 36°F - 46°F): до 1 тижня
 - В побутовій морозильній камері (-10°C - -20°C / 14°F - -4°F): До 1 року

Для визначення антиспермальних антитіл у насінній плазмі, будь ласка, використовуйте наш набір Спермальне антитіло (насінна плазма) ELISA (EIA-4249).

УВАГА! Нема жодних методів тестування, які гарантують, що зразки або реагенти не містять вірусу гепатиту В, ВІЛ (HIV/HTLV-III/LAV), та інших збудників інфекційних захворювань. Тому, всі продукти крові, включаючи зразки пацієнтів слід вважати потенційно інфекційними.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Довести всі реагенти до кімнатної температури та ретельно перемішати перед використанням.
- Приготування промивного розчину (10x):
Розчинити концентрований промивний розчин (50 мл), додавши 450 мл дистильованої або деіонізованої води.
Увага: Не використовувати неочищену водопровідну воду!
- Розведіть сироватку 1: 100 буфером для розведення (розведення 1:100: 5 мкл сироватки + 495 мкл буферу).
- Встановіть необхідну кількість лунок або стрипів на тримачі.
- Піпетувати 50 мкл стандартів у відповідні лунки.
- Піпетувати 50 мкл розведеної сироватки (використовуючи одноразові наконечники) у відповідні лунки.
- Інкубувати протягом 60 хв, при температурі 37°C. Рекомендується використання зволожувальної камери.
- Різно потрусити вміст лунок, а потім промити лунки 5 разів з 200 мкл розведеного промивного розчину.
- Витрусити залишки води із лунок, постукавши (в тримачі) по поверхні, покритій абсорбуючим папером або тканиною.
- Внесіть 50 мкл ферментного кон'югату у кожну лунку.
- Інкубувати протягом 60 хв при температурі 37°C. Рекомендується використовувати зволожувальну камеру.
- Різно потрусити вміст лунок, а потім промити лунки 5 разів з 200 мкл розведеного промивного розчину.
- Витрусити залишки води із лунок, постукавши (в тримачі) по поверхні, покритій абсорбуючим папером або тканиною.
- Внесіть 50 мкл розчину субстрату у кожну лунку одразу після промивання.
- Інкубувати при кімнатній температурі протягом 30 хв.

- Зупиніть ферментативну реакцію, додавши 50 мкл стоп-розчину у кожну лунку в тій же послідовності та з однаковим проміжком часу, в якій додавали субстрат.
- Виміряйте абсорбцію зразків при 450 нм. Рекомендується проводити вимірювання абсорбції через 10 хвилин після припинення реакції.

Як правило, ферментативна реакція лінійно пропорційна часу та температурі. Це робить інтерполяцію можливою при фіксованих фізико-хімічних умовах.

Оскільки, калібратори аналізують при кожному запуску, коливання абсорбції не впливають на правильність результату. У будь-якому разі, рекомендується використовувати додатковий внутрішній контроль.

Схема піпетування для набору ELISA для визначення антиспермальних антитіл

	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 цій схемі рекомендовані позиції для бланків (використовувати буфер для розведення, які входять до набору), стандарти (S1-S4), позитивні контролю (PC) та зразки пацієнтів (P1-P42), показані у двох примірниках.

13. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Обчисліть значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнтів.
- Оптична щільність кожного стандарту показане на графіку як значення Y (на осі Y), а відповідне значення антисперматозоїдних антитіл – як значення X (на осі X). Отримана калібрувальна крива використовується для визначення значень зразків пацієнтів. Значення ОЩ зразків сироватки співвідносять з відповідною концентрацією антиспермальних антитіл інтерполяцією.
- За допомогою середнього значення абсорбції для кожного зразка визначити концентрації антисперматозоїдних антитіл у Од/мл за стандартною прямою.

14. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

При температурі вище 30°C (86°F) зразки слід транспортувати охолодженими. Час зупинки (ферментативної реакції) можливо доведеться зменшити.

Не використовувати сильно ліпемічні або гемолізовані зразки сироватки, а також сироватки пацієнтів із захворюваннями печінки. Результати можуть змінитися під впливом певних патологічних умов, напр., полі- або моноклональних гамопатій, аутоімунних захворювань або при змінному імунному статусі.

15. ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИВ

Нормальні значення: 0-60 О/мл
Підвищені значення: понад 60 О/мл
Якщо значення в межах близько значення cut-off (від 55 – 65 О/мл), рекомендується додаткове вимірювання з використанням нового зразка, зібраного протягом 2 тижнів.

16. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Коефіцієнт варіації в аналізі:** 6.88% (5.90 – 7.81%)
Для визначення коефіцієнту внутрішньої варіації використовували 6 наборів 6 різних партій (з різними датами виробництва). Один зразок пацієнта (ОГ = 1.0) використовувався 96 разів за одну постановку.
- Коефіцієнт варіації між аналізами:** 6.45% (4.84 – 7.52%)
Для визначення коефіцієнту зовнішньої варіації використовували по 1 стрипу із 12 наборів з 6 різних партій (з різними датами виробництва). Один зразок пацієнта (ОГ = 1.0) використовували 72 рази за одну постановку.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

