

НАБІР РЕАГЕНТІВ

СПЕРМАЛЬНІ АНТИТІЛА (СПЕРМА) ELISA

Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA

Каталог. №: **EIA-4249**

Дата випуску інструкції: **2015/11**
Версія **6.0**



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

1. НАЗВА І ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ELISA Спермальне антитіло від DRG – це надійний і кількісний тест для визначення антитіл спрямованих проти людських сперматозоїдів. Цей тест призначений для використання зі *сім'яною плазмою*.

Зверніть увагу: терміни «антисперматозоїдні антитіла», «антиспермальні антитіла» є еквівалентними.

В цих інструкціях використовується не дуже розповсюджений, але правильний термін «антисперматозоїдні антитіла».

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Антитіла, спрямовані проти антигенів сперматозоїдів, можуть викликати безпліддя у жінок або чоловіків. Рекомендується застосовувати набір ІФА Антисперматозоїдні антитіла від DRG для діагностики імунологічно викликаних порушень фертильності.

Небажана бездітність є зростаючою проблемою, з якою до 20% всіх пар у репродуктивному віці стикаються тимчасово або довгостроково. У 20% цих випадків можна виявити антитіла до сперматозоїдів у чоловіка або жінки (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Визначення безпліддя за даними ВООЗ (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999) - це відсутність зачаття протягом 12 місяців незахищеного статевого акту. Основною причиною порушення імунологічної фертильності є утворення антитіл, спрямованих проти антигенів сперматозоїдів.

Анти-сперматозоїдні антитіла надають гетерогенний вплив на здатність сперматозоїдів до запліднення. Добре відомим є інгібуєчий ефект анти-сперматозоїдних антитіл на моторику сперматозоїдів шляхом зв'язування з їх поверхнею і аглютинуючими процесами (Zouari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

Проникнення сперматозоїдів у цервікальний слиз порушується присутністю анти-сперматозоїдних антитіл у сім'яній плазмі та / або у цервікальному слизі (Eggert-Kruse W et al: Hum Reprod (1993) 8, 1025-31). Анти-сперматозоїдні антитіла негативно впливають на конденсацію і 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 ооцитом і подальше зв'язування і проникнення в zona pellucida можуть бути пригнічені антисперматозоїдними антитілами. Наступне злиття ооцита і сперматозоїда також може бути порушено присутністю анти-сперматозоїдних антитіл (Mazumdar S et al: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

За даними Crosignani et al. (Crosignani et al: PG et al: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) швидкість вагітності у пар з антисперматозоїдними антитілами з боку чоловіка або жінки на 38% нижче порівняно з контрольними групами. Крім того, може бути підтверджено вплив на імплантацію та на ранній ембріологічний розвиток. Обговорюється зв'язок між анти-сперматозоїдними антитілами і викиднями.

Частота анти-сперматозоїдних 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).

Анти-сперматозоїдні антитіла можуть з'являтися розчинені в еякуляті або пов'язані з поверхнею сперматозоїдів. Анти-сперматозоїдні антитіла можна знайти у чоловіків і у жінок (Clarke GN et al: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). У жінок антитіла до сперматозоїдів можуть бути знайдені в цервікальному слизі, рідині яйцепровода і у фолікулярній рідині. Чоловіки, які мають більше 50% своїх сперматозоїдів, покритих антитілами до сперматозоїдів, демонструють помітно знижену швидкість фертильності (Abshagen K et al: Fertil Steril (1998) 70, 355-6).

3. ЗАСТОСУВАННЯ

Набір ELISA Спермальне антитіло – це частина клінічної практики для діагностики імунологічно викликаного безпліддя у чоловіків.

4. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

DRG Спермальне Антитіло ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) - це

твердофазний ферментний імуноаналіз типу «сендвіч» для кількісного визначення антитіл до сперматозоїдів у людській сім'яній плазмі.

Мікропланшет покритий сумішшю сперматозоїдних протеїнів, які розпізнаються антисперматозоїдними антитілами. Зразки і стандарти спочатку піпетують у лунки, а потім інкубують. Під час інкубації антисперматозоїдні антитіла зв'язуються зі сперматозоїдними протеїнами і таким чином фіксуються на планшеті. 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 окислює потім доданий субстрат ТМБ (3,3', 5,5' - тетраметилбензидин), отримуючи кольорову реакцію, яку можна зупинити 0.25 М сірчаної кислоти (H₂SO₄). Припинення вимірюється при довжині хвилі 450 нм мікропланшетним зчитувачем. Рекомендується використовувати референтне вимірювання з довжиною хвилі ≥ 550 нм.

5. РЕАГЕНТИ

(достатньо для 96 вимірювань)

1. **Мікротитрові смужки** покриті антигеном сперми 96 лунок
2. **Набір стандартів ELISA** Спермальне антитіло- на 0.5 мл флакон
 - Стандарт 1 (31 О/мл – безбарвна кришечка)
 - Стандарт 2 (62 О/мл – біла кришечка)
 - Стандарт 3 (125 О/мл – жовта кришечка)
 - Стандарт 4 (250 О/мл – голуба кришечка)
3. **Контроль** (зелена кришечка) еквівалентний до 70 – 120 О/мл 0.5 мл
4. **Буфер для розведення** (також використовується як бланк / 0 стандарт / 0 О/мл) 50 мл
5. **Промивний розчин** (10x концентрований) 50 мл
6. **Ферментний кон'югат** (готовий до використання) 8 мл
7. **Розчин субстрату** (розчин ТМБ, готовий до використання) 13 мл
8. **Стоп розчин** (0.25 моль/л H₂SO₄) 13 мл
9. Тримач для окремих смужок 1 x
10. Клейкий листок 2 x

6. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ В НАБОРІ

1. Мікропланшетний зчитувач з фільтром 450 нм, вибірково з референтним фільтром ≥ 550 нм.
2. Мікротитрові піпетки з одноразовими наконечниками: 5 мкл, 50 мкл та 500 мкл.
3. Пробірки для розведення зразків.
4. Дистильована або деіонізована вода
5. Абсорбуючий папір
6. Будь ласка використовуйте тільки калібровані піпетки та інструменти.

7. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Цей набір призначений тільки для *in vitro* використання.
2. Уникайте контакту зі стоп Розчин, тому що це може викликати подразнення шкіри або опіки.
3. Не піпетуйте реагенти ротом.
4. Усі зразки розглядайте як потенційно небезпечні та використовуйте їх з особливою ретельністю.
5. Обробку та утилізацію слід здійснювати відповідно до національних правил або норм національної біологічної безпеки.

8. ІНСТРУКЦІЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ РЕАГЕНТІВ

1. Компоненти цього набору призначені для використання як інтегральна одиниця і не потрібно їх замінювати компонентами з інших наборів.
2. Перед використанням всі реагенти і зразки слід довести до кімнатної температури.
3. Всі реагенти слід перемішати, не утворюючи, при цьому, піну.
4. Процедура тестування слід проводити безперервно.
5. Піпетуйте всі реагенти і зразки на дно лунок. Не потрібно перемішувати їх або струшувати після піпетування.
6. Використовуйте нові одноразові наконечники для кожного зразка.
7. До початку аналізу, всі реагенти повинні бути приготовленими і готовими до негайного використання, всі необхідні смужки закріплені у тримачі та ін. Це забезпечить однаковий період часу для кожного етапу піпетування.
8. Для оптимальних результатів важливим є ретельне миття лунок після інкубації та витирання останньої краплі води.
9. Оскільки кінетика ферментативної реакції залежить від температури навколишнього середовища, то можуть спостерігатися різні екстинкції, що корелюють з відповідною температурою приміщення.

Оптимальна кімнатна температура лабораторії становить 20 °C - 22 °C (68 °F - 72 °F).

10. Рекомендується проводити всі тести з подвійним визначенням, щоб мінімізувати наслідки піпетування або помилок обробки.

9. РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

1. Зберігати реагенти при температурі 2°C - 8°C (36°F - 46°F).
2. Реагенти залишаються стабільними до закінчення терміну придатності.
3. Розбавлений промивний розчин стабільний протягом 4 тижнів при температурі холодильника (4 °C - 8 °C / 39 °F - 49 °F).
4. Закрутити кришечки негайно після використання.
5. Зберігати мікротитрові смужки у сухій упаковці з осушувачем. Смужки, які залишилися. Потрібно зберігати щільно герметично закритими з осушувачем. Якщо дотримуватися цих умов, вони можуть бути стабільними щонайменше 4 тижні після відкриття упаковки.

10. МАТЕРІАЛ ЗРАЗКА

Сім'яна плазма

11. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Зберіть свіжий еякулят, центрифугуйте при кімнатній температурі та візьміть настояну (сім'яну плазму). Уникайте повторного заморожування і розморожування сім'яної плазми. Зберігати пробірки закритими, оскільки існує небезпека забруднення або зміни концентрації.

1. Обробляйте всі зразки з особливою обережністю, оскільки вони можуть бути інфекційними.
2. Не виявлено впливу зовнішніх факторів або інших речовин.
3. Зразки можна зберігати при різній температурі у визначені періоди часу:
 - Температура навколишнього середовища до 30 °C (86°F): до 3 днів
 - температура холодильника (2 °C - 8 °C / 36 °F - 46 °F): до одного тижня
 - температура побутової морозилки (-10 °C до -20 °C / 14 °F до -4 °F): до 1 року

УВАГА! Не існує методів тестування, які могли б гарантувати, що вірус гепатиту В, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ / HTLV-III / LAV) або інші інфекційні агенти відсутні в реагентах цього набору. Тому всі людські продукти людського походження, включаючи зразки пацієнтів, слід вважати потенційно інфекційними.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Нагрійте всі реагенти до кімнатної температури та ретельно перемішайте перед використанням.
2. Підготовка промивного розчину: (10x): Розведіть концентрований промивний розчин (50мл) додаючи 450 мл дистильованої або деіонізованої води. **Увага:** Не використовуйте неочищену воду з водопроводу!
3. Розведіть сім'яну плазму **1:5 (1+4)** з буфером розведення, наприклад, розведіть 100 мкл сім'яної плазми 400 мкл буфером розведення.
4. Закріпіть необхідну кількість покритих лунок або смужок у тримачі смужок.
5. Піпетуйте 50 мкл стандартів у відповідні лунки.
6. Піпетуйте 50 мкл розведеної сім'яної плазми за допомогою нових одноразових наконечників у відповідні лунки.
7. Інкубуйте протягом 60 хвилин при температурі 37 °C. **Рекомендується використовувати клейку плівку, яка постачається в наборі, бо ще краще** використовуйте зволожувальну камеру, щоб мінімізувати втрати рідини під час випаровування.
8. Різно витрясіть вміст лунок та промийте 3 рази 200 мкл розведеного промивного розчину.
9. Витрясіть залишки води з лунок перевернувши їх (в тримачі) на абсорбуючий папір або тканину.
10. Додайте 50 мкл ферментного кон'югату у кожну лунку.
11. Інкубуйте протягом 60 хвилин при температурі 37 °C. **Рекомендується використовувати клейку плівку, яка постачається в наборі, бо ще краще** використовуйте зволожувальну камеру, щоб мінімізувати втрати рідини під час випаровування.
12. Різно витрясіть вміст лунок та промийте 5 разів 200 мкл розведеного промивного розчину.
13. Витрясіть залишки води з лунок перевернувши їх (в тримачі) на абсорбуючий папір або тканину.
14. Додайте 50 мкл розчину субстрату негайно після промивання кожної лунки.
15. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

16. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши 50 мкл стоп розчину у кожну лунку у тій же послідовності і через однаковий проміжок часу, в якій додавався субстрат.
17. Виміряйте поглинання зразків при 450 нм. Рекомендується проводити вимірювання поглинання протягом 10 хвилин після припинення реакції.

Як правило, ферментативна реакція лінійно-пропорційна до часу та температури. Це робить можливим інтерполяцію для фіксованих фізико-хімічних умов.

Оскільки, калібрувальники аналізуються в кожному циклі, коливання абсорбції не впливають на абсолютні результати. У будь-якому випадку дуже рекомендується використовувати додатковий внутрішній контроль, якщо такий є.

Схема піпетування для ELISA Спермальне антитіло

	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

У цій піпетувальній схемі рекомендовані позиції для бланку(використовуйте буфер розведення вкладений у цей набір), стандартів (S1 - S4), позитивний контроль (PC) і для зразків пацієнта (P1 - P42) показані як подвійні визначення.

13. ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Обчисліть середнє значення абсорбції для кожного набору референтних стандартів, контролів та зразків пацієнта.
2. Оптична щільність кожного значення стандарту відображається як значення у (на осі у), а відповідні значення антисперматозоїдних антитіл зображені як значення х (на осі х). Отримана калібрувальна крива використовується для визначення значень зразків пацієнта. Значення ОЩ зразків сім'яної плазми корелюють з відповідними значеннями концентрації антитіл сперми шляхом інтерполяції.
3. Використовуючи середнє значення для кожного зразка визначіть відповідну концентрацію антитіла до сперматозоїдів у О/мл зі стандартної кривої.

14. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

При температурі вищій ніж 30°C (86°F) зразки потрібно транспортувати охолодженими або у холодильнику. Час зупинки (ферментативної кольорової) реакції, можливо потрібно буде зупинити (скоротити).

15. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Нормальні значення: 0- 60 О/мл

Підвищені значення: вище 60 О/мл

У разі значення в діапазоні приблизно cut-off (від 55 до 65 О/мл) ми рекомендуємо подальше визначення з використанням нової проби, взятої протягом наступних двох тижнів.

16. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

1. Коефіцієнт варіації в аналізі: 6.44% (5.69 - 7.92%)

Для визначення коефіцієнту в аналізі використовували 6 наборів з 6 різних лотів (з різними датами виготовлення). Один зразок пацієнта (оптична щільність приблизно 1.0) застосовувався 96 разів за одну процедуру тестування.

2. Коефіцієнт варіації між аналізами: 7.15% (6.04 - 8.21)

Для визначення коефіцієнту зовнішньої варіації використовувалась по одній смужці з 12 наборів із 6 різних партій (з різними датами виготовлення). Один зразок пацієнта (оптична щільність приблизно 1.0) застосовувався 72 рази за одну процедуру тестування.



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.drg-diagnostics.de
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drg@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

