



## Instructions for Use

# Sperm Antibody ELISA

IVD



REF EIA-1826

$\Sigma$  96



**DRG**

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG**

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.  
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	NAME AND INTENDED USE.....	3
2	CLINICAL RELEVANCE .....	3
3	FIELDS OF APPLICATION .....	3
4	PRINCIPLE OF THE ASSAY METHOD .....	4
5	REAGENTS .....	4
6	MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED .....	4
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	4
8	INSTRUCTIONS FOR REAGENT PREPARATION.....	5
9	STORAGE INSTRUCTIONS AND SHELF LIFE INFORMATION .....	5
10	SAMPLE MATERIAL.....	5
11	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
12	ASSAY PROCEDURE .....	6
13	CALCULATION OF RESULTS.....	7
14	LIMITATIONS OF THE ASSAY.....	7
15	EXPECTED VALUES.....	7
16	ASSAY PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
1	NAME UND VERWENDUNGSZWECK.....	8
2	KLINISCHE RELEVANZ .....	8
3	ANWENDUNGSGEBIETE .....	8
4	TESTPRINZIP.....	9
5	BESTANDTEILE DES KITS .....	9
6	ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND .....	9
7	WARNUNGEN UND HINWEISE.....	9
8	HINWEISE ZUR VORBEREITUNG DER TESTBESTANDTEILE .....	10
9	HINWEISE ZU LAGERUNG UND HALTBARKEIT.....	10
10	PROBENMATERIAL .....	10
11	PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG.....	10
12	TESTDURCHFÜHRUNG .....	11
13	AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE .....	12
14	BESCHRÄNKUNGEN DES TESTES.....	12
15	ERWARTETE WERTE.....	12
16	LEISTUNGSDATEN.....	12

---

1	IMPIEGO DEL TEST .....	13
2	SIGNIFICATO CLINICO .....	13
3	SETTORI DI APPLICAZIONE .....	13
4	PRINCIPIO DEL METODO .....	14
5	REAGENTI .....	14
6	MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO .....	14
7	ACCORGIMENTI E PRECAUZIONI.....	14
8	ISTRUZIONI PER LA PREPARAZIONE DEI REATTIVI .....	15
9	CONSERVAZIONE DEL KIT E DURATA.....	15
10	CAMPIONE .....	15
11	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE .....	15
12	PROCEDIMENTO .....	16
13	CALCOLO DEI RISULTATI .....	17
14	LIMITAZIONI DEL TEST .....	17
15	VALORI ATTESI.....	17
16	PERFORMANCE DEL TEST .....	17
1	NOMBRE Y FINALIDAD .....	18
2	IMPORTANCIA CLÍNICA .....	18
3	CAMPOS DE APLICACIÓN .....	18
4	FUNDAMENTO DEL ENSAYO .....	19
5	REACTIVOS .....	19
6	MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS .....	19
7	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	19
8	INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	20
9	INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO E INFORMACIÓN DE VIDA EN ESTANTERÍA.....	20
10	MATERIAL DE LAS MUESTRAS.....	20
11	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	20
12	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....	21
13	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS .....	22
14	LIMITACIONES DEL ENSAYO .....	22
15	VALORES ESPERADOS .....	22
16	CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE.....	22
	SYMBOLS USED.....	23

## 1 NAME AND INTENDED USE

The Sperm Antibody ELISA is a reliable and quantitative test for the determination of antibodies directed against human spermatozoa. This test is intended for the use with serum.

**Please note:** the terms “anti-spermatozoa antibodies”, “anti-sperm antibodies” and “sperm antibodies” are equivalent. In these instructions the rather unwieldy but correct term “anti-spermatozoa antibodies” is used.

## 2 CLINICAL RELEVANCE

Antibodies directed against spermatozoa antigens may cause infertility in women or men. The application of the Anti-Spermatozoa Antibody ELISA is recommended for the diagnosis of immunologically caused disorders of fertility.

Unwanted childlessness is a growing problem with which up to 20% of all couples in the reproductive age are confronted temporarily or long-term. In 20% of these cases the presence of anti-spermatozoa antibodies in the male or the female patient is detectable (Lahteenmaki A *et al.*: *Hum Reprod* (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP *et al.*: *Hum Reprod* (1995) 10, 1775-80).

The definition of infertility according to the WHO (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999) is the absence of a conception within 12 months of unprotected intercourse. The main cause of an immunological fertility disorder is the formation of antibodies directed against spermatozoa antigens.

Anti-spermatozoa antibodies exert heterogeneous effects on the ability of spermatozoa to fertilize. The inhibiting effect of anti-spermatozoa antibodies on the motility of spermatozoa by binding to their surface and by agglutinating processes is well-known (Zouari R *et al.*: *Fertil Steril* (1993) 59, 606-12).

The penetration of the spermatozoa into the cervical mucus is impaired by the presence of anti-spermatozoa antibodies in the seminal plasma and/or in the cervical mucus (Eggert-Kruse W *et al.*: *Hum Reprod* (1993) 8, 1025-31). Anti-spermatozoa antibodies negatively influence the capacitation and the acrosome reaction of spermatozoa and thereby impede the interaction of the spermatozoa with the oocyte (Francavilla F *et al.*: *Front Biosci* (1999): 1;4:9-25; Bohring C *et al.*: *Hum Reprod* (2001) 7:113-8).

The interaction of the spermatozoon with the oocyte and the subsequent binding to and penetration of the zona pellucida may be inhibited by anti-spermatozoa antibodies. The following fusion of the oocyte and a spermatozoon may also be impaired by the presence of anti-spermatozoa antibodies (Mazumdar S *et al.*: *Fertil Steril* (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: *Hum Reprod*, (1999) 14, 2426-9).

According to Crosignani *et al.* (Crosignani *et al.*: *PG et al.*: *Hum Reprod* (1998) 13, 2025-32) the rate of pregnancies in couples with anti-spermatozoa antibodies on the part of the man or the woman are 38% lower compared to the control groups. Furthermore an influence on the implantation and on the early embryological development could be confirmed. An association of anti-spermatozoa antibodies and miscarriages is discussed.

The frequency of anti-spermatozoa antibodies in infertile couples amounts to 20% (Lahteenmaki A *et al.*: *Hum Reprod* (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP *et al.*: *Hum Reprod* (1995) 10, 1775-80).

Anti-spermatozoa antibodies may occur dissolved in the ejaculate or bound to the surface of spermatozoa. Anti-spermatozoa antibodies may be found in men and in women (Clarke GN *et al.*: *Am J Reprod Immunol Microbiol* (1985) 7, 143-7). In women anti-spermatozoa antibodies may be found in cervical mucus, oviduct liquid and follicular liquid. Men having more than 50% of their spermatozoa coated with anti-spermatozoa antibodies show a conspicuously reduced rate of fertility (Abshagen K *et al.*: *Fertil Steril* (1998) 70, 355-6).

## 3 FIELDS OF APPLICATION

The Sperm Antibody ELISA is a part in clinical practice to diagnose immunologically caused infertility in men and in women.

#### 4 PRINCIPLE OF THE ASSAY METHOD

The Sperm Antibody ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) is a solid-phase sandwich enzyme-immunoassay for the quantitative determination of anti-spermatozoa antibodies in human serum.

The ELISA-plate is coated with a mix of spermatozoa proteins which are recognized by anti-spermatozoa antibodies. The samples and standards are pipetted into the wells and then incubated. During this incubation anti-spermatozoa antibodies bind to the spermatozoa proteins and are thus immobilised on the plate. After washing the enzyme conjugate, consisting of anti-human globulin antibodies covalently coupled to horseradish peroxidase, is added. After removal of the unbound conjugate by washing the horseradish peroxidase oxidizes the then added substrate TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) yielding a colour reaction which is stopped with 0.25 M sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The extinction is measured at a wavelength of 450 nm with a microplate reader. The use of a reference measurement with a wavelength  $\geq 550$  nm is recommended.

#### 5 REAGENTS

(sufficient for 96 determinations)

1. <b>Microtiter strips</b> coated with sperm antigen	96 wells
2. Sperm Antibody ELISA standard set - per vial	0.5 mL
- Standard 1 ( 31 U/mL – colourless screw cap)	
- Standard 2 ( 62 U/mL – white screw cap)	
- Standard 3 (125 U/mL – yellow screw cap)	
- Standard 4 (250 U/mL – blue screw cap)	
3. <b>Control</b> (green screw cap)	0.5 mL
4. <b>Dilution buffer</b> (also used as blank / zero standard / 0 U/mL )	2 x 50 mL
5. <b>Washing solution</b> (10x concentrated)	50 mL
6. <b>Enzyme conjugate</b> (ready for use)	8 mL
7. <b>Substrate solution</b> (solution of TMB, ready for use)	13 mL
8. <b>Stop Solution</b> (0.25 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	13 mL
9. Holder for single strips	1 x

#### 6 MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

1. Microplate reader with 450 nm filter, optionally with a reference filter  $\geq 550$  nm.
2. Microliter pipettes with disposable tips: 5  $\mu$ L, 50  $\mu$ L and 500  $\mu$ L.
3. Tubes for the dilution of the samples
4. Distilled or deionised water
5. Absorbent paper.
6. Please use only calibrated pipettes and instruments.

#### 7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is intended for *in vitro* use only.
2. Avoid contact with the stop Solution, it may cause skin irritations and burns.
3. Do not pipette reagents by mouth.
4. Please regard all samples as potentially infectious and handle them with utmost care.
5. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation where this exists.

## 8 INSTRUCTIONS FOR REAGENT PREPARATION

1. The components of this kit are intended for use as an integral unit and should not be interchanged with the components of other kits.
2. All reagents and specimens must be brought to room temperature before use.
3. All reagents have to be mixed without foaming.
4. Once the test procedure has been started, all steps should be continued without interruption.
5. Pipette all reagents and samples onto the bottom of the wells. Mixing or shaking after pipetting is not required.
6. Use new disposable tips for each specimen.
7. Before starting the assay, all reagents to be used should be prepared and ready for immediate use, all needed strips should be secured in the holder etc. This will ensure equal time periods for each pipetting step without interruption.
8. For optimal results it is important to wash the wells thoroughly after incubation and to remove even the last water drops by hitting the plate on absorbent paper or cloth.
9. Since the kinetics of the enzymatic reaction depends on the surrounding temperature different extinctions correlating with the respective room temperature may be observed. The optimum laboratory room temperature is 20 °C – 22 °C (68 °F – 72 °F).
10. It is recommended to effect all tests in double determination in order to minimize the consequences of pipetting or handling errors.

## 9 STORAGE INSTRUCTIONS AND SHELF LIFE INFORMATION

1. Store the reagents at 2 °C – 8 °C (36 °F – 46 °F).
2. The reagents remain stable until the expiration date of the kit.
3. The diluted washing solution is stable for 4 weeks at refrigerator temperatures (4 °C – 8 °C / 39 °F – 46 °F).
4. Put caps back on the vials immediately after use.
5. Store the microtiter strips in a dry bag with desiccants. The remaining strips must be stored in the tightly resealed bag together with the desiccants. Under these storage conditions, they are stable at least for 4 weeks after opening of the sealed bag.

## 10 SAMPLE MATERIAL

### Serum

## 11 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature; avoid haemolysis. Avoid repeated freezing and thawing. Store tubes closed as they may be a danger of contamination or alteration of concentration.

1. Handle all samples with utmost care since they may be infectious.
2. There are no known interferences with extrinsic factors or other substances.
3. Samples may be stored at different temperatures for the following time-spans:
  - Environmental temperature up to 30 °C (86 °F): up to three days
  - Refrigerator temperature (2 °C – 8 °C / 36 °F – 46 °F): up to one week
  - Household freezer temperature (-10 °C – -20 °C / 14 °F – -4 °F): up to one year

For the determination of anti-sperm antibodies in seminal plasma please use our Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA (EIA-4249).

**ATTENTION!** There are no test methods available which may guarantee that Hepatitis B virus, Human Immunodeficiency Virus (HIV/HTLV-III/LAV), or other infectious agents are absent from the reagents in this kit. Therefore, all human blood products, including patient samples, should be considered potentially infectious.

**12 ASSAY PROCEDURE**

1. Warm all reagents to room temperature and mix thoroughly before use.
2. Preparation of the washing solution (10x):  
Dilute the concentrated washing solution (50 mL) by adding 450 mL distilled or deionised water.  
**Attention:** Do not use unpurified tap water!
3. Dilute sera 1: 100 with dilution buffer (1:100 dilution: 5 µL of serum + 495 µL of dilution buffer).
4. Fix the required number of coated wells or strips in the strip holder.
5. Pipette 50 µL of standards into the respective wells.
6. Pipette 50 µL of diluted serum with new disposable tips into the respective wells.
7. Incubate for 60 min at 37 °C. The use of a humid chamber is recommended.
8. Briskly shake out the contents of the wells and then rinse the wells 3 times with 200 µL diluted washing solution.
9. Knock the residual water out of the wells by hitting them (in the holder) on absorbent paper or cloth.
10. Dispense 50 µL of the enzyme conjugate into each well.
11. Incubate for 60 min at 37 °C. The use of a humid chamber is recommended.
12. Briskly shake out the contents of the wells and then rinse the wells 5 times with 200 µL diluted washing solution.
13. Knock the residual water out of the wells by hitting them (in the holder) on absorbent paper or cloth.
14. Dispense 50 µL of substrate solution immediately after the washing to each well.
15. Incubate for 30 min at room temperature.
16. Stop the enzymatic reaction by adding 50 µL of stop solution into each well in the same sequence and time interval as dispensing the substrate.
17. Measure the extinction of the samples at 450 nm. It is recommended to carry out the measurement of the extinction within 10 minutes after stopping the reaction.

As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature. This makes interpolation possible for fixed physico-chemical conditions.

Since calibrators are assayed in each run, absorbance fluctuations do not affect the absolute results. In any case it is highly recommended to use an additional internal control if available.

**Pipetting Scheme for the Sperm Antibody ELISA**

	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	

In this pipetting scheme the recommended positions for the blank (please use the dilution buffer included in this kit), standards (S1 – S4), positive control (PC) and for the patient samples (P1 – P42) are shown as double determinations.

### 13 CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance values for each set of reference standards, controls and patient samples
2. The optical density of each standard value is plotted as y value (y-axis), the corresponding anti-spermatozoa antibody value is drawn in as the x-value (x-axis). The resulting calibration curve is used to determine the values of the patient samples. The OD values of the serum samples are correlated with the corresponding sperm antibody concentration values by interpolation.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration of anti-spermatozoa antibody in U/mL from the standard curve.

### 14 LIMITATIONS OF THE ASSAY

At temperatures higher than 30 °C (86 °F) the samples should be transported cooled or refrigerated. The time to stop the (enzymatic colour) reaction may have to be adjusted (shortened).

Severely haemolytic or lipaemic sera or sera from patients with liver diseases should not be used. Results may be adversely affected by certain pathologic conditions, such as poly- and monoclonal gammopathies, autoimmune diseases or by an altered immune status.

### 15 EXPECTED VALUES

Normal values: 0 – 60 U/mL

Elevated values: above 60 U/mL

In the case of a value in the range near the cut-off (55 to 65 U/mL) we recommend a follow-up determination using a new sample taken within the next two weeks.

### 16 ASSAY PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Intra-assay variation coefficient:** 6.88% (5.90 – 7.81 %)

For the determination of the intra-assay variation coefficient 6 kits from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (optical density about 1.0) was applied 96 times per testing procedure.

2. **Inter-assay variation coefficient:** 6.45% (4.84 – 7.52 %)

For the determination of the inter-assay variation coefficient one strip each of 12 kits stemming from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (optical density about 1.0) was applied 72 times per testing procedure



## 1 NAME UND VERWENDUNGSZWECK

Der Sperm Antibody ELISA dient dem Nachweis von Antikörpern gegen Spermatozoen in humanem Serum.

## 2 KLINISCHE RELEVANZ

Antikörper, die gegen Spermatozoen-Antigene gerichtet sind, können Unfruchtbarkeit bei Frauen oder Männern verursachen. Die Anwendung des Anti-Spermatozoen-Antikörper-ELISA wird bei immunologisch begründeten Fertilitätsstörungen empfohlen.

Ungewollte Kinderlosigkeit ist ein wachsendes Problem, mit dem bis zu 20 % aller Paare im reproduktionsfähigen Lebensalter zeitweilig oder ständig konfrontiert werden. In 20 % dieser Fälle werden Anti-Spermatozoen-Antikörper bei männlichen oder weiblichen Patienten nachgewiesen. (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Entsprechend den Bestimmungen der WHO wird Infertilität angenommen, wenn innerhalb von 12 Monaten ungeschützten Geschlechtsverkehrs keine Empfängnis stattgefunden hat (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999). Die Hauptursache einer immunologisch bedingten Fertilitätsstörung ist die Bildung von Antikörpern, die gegen Spermatozoen Antigene gerichtet sind.

Anti-Spermatozoen-Antikörper wirken sich in unterschiedlicher Weise auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen aus. Die hemmende Wirkung der Anti-Spermatozoen-Antikörper auf die Beweglichkeit der Spermatozoen durch Oberflächenbindung und Agglutinationsprozesse ist gut bekannt (Zouari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

Das Durchdringen des Zervikalmucus durch die Spermatozoen wird durch die Anwesenheit von Anti-Spermatozoen-Antikörper im Seminalplasma und/oder im Zervikalmucus beeinträchtigt (Eggert-Kruse W et al: Hum Reprod (1993) 8, 1025-31). Anti-Spermatozoen-Antikörper beeinflussen die Fähigkeit zur Kapazitation und die Akrosomenreaktion der Spermatozoen und behindern dadurch die Interaktion der Spermatozoen mit der Eizelle. (Francavilla F et al: Front Biosci (1999): 1;4:9-25; Bohring C et al.: Hum Reprod (2001) 7:113-8).

Die Interaktion des Spermatozoons mit der Eizelle sowie die spätere Bindung an diese und das Durchdringen der Zona pellucida kann durch Anti-Spermatozoen-Antikörper verhindert werden. Auch die darauf folgende Verschmelzung des Spermatozoons mit der Eizelle kann durch die Anwesenheit von Anti-Spermatozoen-Antikörpern beeinträchtigt werden (Mazumdar S et al.: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

Nach Crosignani et al. (Crosignani et al.: PG et al.: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) ist die Schwangerschaftsquote bei Paaren mit Anti-Spermatozoen-Antikörpern auf Seiten des Mannes oder der Frau im Vergleich zu den Kontrollgruppen um 38 % vermindert. Außerdem konnte ein Einfluss auf die Einnistung des Eies in der Uterusschleimhaut und auf die frühe embryonale Entwicklung bestätigt werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-Spermatozoen-Antikörpern und Fehlgeburten wird diskutiert. Die Häufigkeit von Anti-Spermatozoen-Antikörpern bei infertilen Paaren liegt bei 20 % (Lahteenmaki A et al.: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al.: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Anti-Spermatozoen-Antikörper können sowohl bei Männern als auch bei Frauen gefunden werden (Clarke GM et al.: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). Diese Antikörper können ungebunden im Ejakulat auftreten oder an die Oberfläche von Spermatozoen gebunden sein. Bei Frauen werden Anti-Spermatozoen-Antikörper in Zervikalmucus, Eileiterflüssigkeit und Follikelflüssigkeit nachgewiesen. Männer, deren Spermatozoen zu mehr als 50 % mit Anti-Spermatozoen-Antikörpern bedeckt sind, weisen eine deutlich verringerte Fertilitätsrate auf. (Abshagen K et al.: Fertil Steril (1998) 70, 355-6)..

## 3 ANWENDUNGSGEBIETE

Der Spermatozoen-Antikörper-ELISA ist ein Bestandteil der klinischen Diagnostik zur Diagnose immunologisch bedingter Infertilität bei Männern und Frauen.

#### 4 TESTPRINZIP

Der anti-Spermatozoen-Antikörper detektierende ELISA ist ein Festphasen-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von anti-Spermatozoen-Antikörpern in menschlichen Körperflüssigkeiten.

Die ELISA-Platte ist mit einer Mischung von menschlichen Spermatozoen-Antigenen beschichtet. Die Patientenproben, Standards und Kontrollen werden mit einer Pipette in die einzelnen Näpfe verbracht und dann bebrütet. Während dieser Inkubation binden die anti-Spermatozoen-Antikörper an die an den Näpfen befindlichen Spermatozoen-Antigene und werden dadurch immobilisiert

Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch Waschen wird das Enzymkonjugat, bestehend aus polyklonalen anti-Mensch-Antikörpern und kovalent gebundener Meerrettichperoxidase, in die Näpfe gegeben. Nach der Inkubation und dem anschließenden Waschen (zur Entfernung überschüssigen Konjugates) wird das Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben. Dieses Substrat ergibt nach der Umsetzung durch die Meerrettichperoxidase eine blaue Färbung, die nach Stoppen der Reaktion mit 0,25 M Schwefelsäure in Gelb umschlägt. Die Extinktion wird mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Benutzung einer Referenzwellenlänge von  $\geq 550$  nm wird empfohlen, ist aber nicht zwingend.

#### 5 BESTANDTEILE DES KITS

(ausreichend für 96 Bestimmungen)

1.	12 <b>Mikrotiterstreifen</b> à 8 Näpfe, beschichtet mit Sperma-Antigen	96 Näpfe
2.	Sperma-Antikörper ELISA <b>Standardreihe</b> – pro Fläschchen - Standard 1, ( 31 Einheiten/mL Serum – farbloser Schraubdeckel) - Standard 2, ( 62 Einheiten/mL Serum – weißer Schraubdeckel) - Standard 3, (125 Einheiten/mL Serum – gelber Schraubdeckel) - Standard 4, (250 Einheiten/mL Serum – blauer Schraubdeckel)	0,5 mL
3.	<b>Kontrolle</b> (grüner Schraubdeckel)	0,5 mL
4.	<b>Verdünnungspuffer</b> (wird auch als Blank / Nullstandard / 0 U/mL verwendet)	2 x 50 mL
5.	<b>Waschpuffer</b> (10-fach konzentriert)	50 mL
6.	<b>Enzymkonjugat</b> (gebrauchsfertig)	8 mL
7.	<b>Substratlösung</b> (TMB, gebrauchsfertig)	13 mL
8.	<b>Stopplösung</b> (0,25 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	13 mL
9.	Halterung für einzelne Streifen	1 x

#### 6 ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND

1. Mikrotiterplattenleser mit 450 nm Filter, optional mit einem Referenzfilter  $\geq 550$  nm.
2. Mikroliterpipetten mit auswechselbaren Spitzen: 5  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, and 500  $\mu$ L.
3. Röhrchen für die Verdünnung der Proben.
4. Destilliertes Wasser.
5. Saugfähiges Papier.
6. Bitte verwenden Sie nur kalibrierte Pipetten und Geräte.

#### 7 WARNUNGEN UND HINWEISE

1. Dieser Testkit ist nur zur in-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Vermeiden Sie den Kontakt mit der Stopplösung (0,25 mol/l Schwefelsäure), sie könnte Hautirritationen und Verätzungen auslösen.
3. Pipettieren Sie niemals mit dem Mund.
4. Bitte betrachten Sie alle Proben als potenziell infektiös, und bearbeiten Sie sie nur mit äußerster Sorgfalt.
5. Der Umgang und die Entsorgung soll entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien erfolgen.

## 8 HINWEISE ZUR VORBEREITUNG DER TESTBESTANDTEILE

1. Die Bestandteile dieses Kits bilden eine integrale Einheit und dürfen daher nicht mit den Bestandteilen anderer Kits gemischt werden.
2. Bringen Sie alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur.
3. Durchmischen Sie alle Reagenzien gründlich und ohne Schaumbildung.
4. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
5. Pipettieren Sie alle Reagenzien und Proben auf den Grund der Näpfe. Mischen oder Schütteln nach dem Pipettieren ist nicht erforderlich.
6. Verwenden Sie für jede Probe jeweils eine neue Pipettenspitze.
7. Bringen Sie vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand (z.B. die Proben vorverdünnen, die benötigten Näpfe in den Halter setzen etc.). Eine gute Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Unterbrechung und vermeidet damit das Auftreten einer Drift.
8. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die Näpfe nach den einzelnen Inkubationsschritten gründlich zu waschen und nach dem Waschen (jeweils letzten Waschschrift) die in den Näpfen verbliebenen Flüssigkeitstropfen durch Ausklopfen auf saugfähiger Unterlage zu entfernen.
9. Da Enzymreaktionen grundsätzlich temperaturabhängig sind, können aufgrund der jeweiligen Labortemperatur unterschiedliche Extinktionen auftreten. Die in dieser Anleitung angegebenen Werte beziehen sich eine Labortemperatur von 20 °C – 25 °C.
10. Die Durchführung aller Tests im Doppelansatz ist empfehlenswert, da nur auf diese Weise Pipettier- oder Handhabungsfehler erkannt werden können.

## 9 HINWEISE ZU LAGERUNG UND HALTBARKEIT

1. Lagern Sie die Reagenzien bei 2 °C – 8 °C.
2. Die Reagenzien sind haltbar bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums des Kits.
3. Der verdünnte Waschpuffer ist für 4 Wochen bei Kühlschranktemperatur haltbar (2 °C – 8 °C).
4. Verschließen Sie die Fläschchen unmittelbar nach dem Gebrauch.
5. Bewahren Sie die Mikrotiterstreifen im Folienbeutel mit Trockensubstanz auf. Verschließen Sie nach dem Öffnen und Entnehmen der Streifen die Folie wieder fest. Gut verschlossen sind die Mikrotiterstreifen im Kühlschrank nach Anbruch mindestens vier Wochen haltbar

## 10 PROBENMATERIAL

### Serum

## 11 PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Entnehmen Sie Blut durch Venenpunktion und separieren Sie das Serum nach der Gerinnung durch Zentrifugieren bei Raumtemperatur. Vermeiden Sie eine Hämolyse. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Bewahren Sie die Röhrchen verschlossen auf, da die Lösungen sonst ihre Konzentration verändern können und ein Kontaminationsrisiko besteht.

1. Bearbeiten Sie alle Proben mit äußerster Sorgfalt und betrachten Sie sie grundsätzlich als potenziell infektiös.
2. Es sind keine Interferenzen mit extrinsischen Faktoren oder anderen Substanzen bekannt.
3. Die Proben können bei verschiedenen Temperaturen für folgende Zeitspannen aufbewahrt werden:
  - Umgebungstemperatur bis zu 30 °C : bis zu drei Tagen
  - Kühlschranktemperatur (2 °C – 8 °C) bis zu einer Woche
  - Haushaltsgefrierschranktemperatur (-10 °C – -20 °C): bis zu einem Jahr

Zur Bestimmung von anti-Spermatozoen-Antikörpern in Seminalplasma verwenden Sie bitte den Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA (EIA-4249).

### Vorsichtsmaßnahmen:

Untersuchungsmaterial von Patienten, wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Proben von Risikopatienten sollten stets gekennzeichnet und unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen bearbeitet werden. Darüber hinaus sind die jeweils geltenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen einzuhalten. Insbesondere müssen stets geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe getragen werden.

**ACHTUNG!** Es sind keine Testsysteme erhältlich, die garantieren können, dass die Reagenzien dieses Kits absolut frei sind von Hepatitis B-Viren, Human Immunodeficiency Virus (HIV) oder anderen Krankheitserregern.

## 12 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur und durchmischen Sie sie vor Gebrauch sorgfältig.
2. Vorbereitung des Waschpuffers (10-fach konzentriert):  
Verdünnen Sie den konzentrierten Waschpuffer (50 mL) mit 450 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser.  
**Achtung:** Verwenden Sie kein Leitungswasser!
3. Verdünnen Sie die Proben im Verhältnis 1: 100 mit Verdünnungspuffer (Verdünnung 1:100: 5 µL Serum + 495 µL Verdünnungspuffer).
4. Befestigen Sie die benötigte Anzahl beschichteter Mikrotiterstreifen in der Halterung und beschriften Sie ein Pipettierschema entsprechend. Die Mikrotiterstreifen sind nach Anbruch der Packung innerhalb von vier Wochen zu verbrauchen.
5. Pipettieren Sie 50 µL der Standards in die entsprechenden Näpfe.
6. Pipettieren Sie 50 µL der verdünnten Serumproben in die entsprechenden Näpfe.
7. Inkubieren Sie den Ansatz 60 Minuten bei 37 °C. Wir empfehlen die Benutzung einer feuchten Kammer.
8. Schütten Sie die Inkubationslösung ab und waschen Sie die Näpfe 3 mal mit jeweils 200 µL verdünntem Waschpuffer.
9. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Näpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier oder Tuch. Belassen Sie zum Ausklopfen die Streifen in der Halterung.
10. Pipettieren Sie jeweils 50 µL des Enzymkonjugates in die Näpfe.
11. Inkubieren Sie den Ansatz 60 Minuten bei 37 °C. Wir empfehlen die Benutzung einer feuchten Kammer.
12. Schütten Sie die Inkubationslösung ab und waschen Sie die Näpfe 5 mal mit jeweils 200 µL verdünntem Waschpuffer.
13. Klopfen Sie die verbliebenen Flüssigkeitsreste aus den Näpfen durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier oder Tuch. Belassen Sie zum Ausklopfen die Streifen in der Halterung.
14. Pipettieren Sie 50 µL der Substratlösung unmittelbar nach dem Waschvorgang in die entsprechenden Näpfe.
15. Inkubieren Sie den Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur (15 °C – 30 °C).
16. Beenden Sie die enzymatische Reaktion durch Hinzugabe von 50 µL Stopplösung in jeden Napf. **Achtung:** Pipettieren Sie die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und in den gleichen Zeitintervallen wie die Substratlösung (siehe Punkt 14 oben). Dies ist sehr wichtig, da ansonsten die leichten Unterschiede bei den Inkubationszeiten aufgrund einer auftretenden Drift zu verschiedenen starken Farbreaktionen führen könnten!
17. Bestimmen Sie die Extinktion in jedem Napf mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm. Wir empfehlen, die Farbreaktionen innerhalb von 10 Minuten nach dem Abstoppen zu messen. Jedes Mikrotiterplatten-Photometer mit einem 450-nm-Filter kann verwendet werden. Eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge von >550 nm wird empfohlen, ist aber nicht zwingend.

Enzymatische Reaktionen sind proportional zu Inkubationszeit und -temperatur. Dies ermöglicht, bei anderweitig fixierten physikochemischen Bedingungen, eine Interpolation und damit das Erstellen einer Standardkurve.

Da bei jedem Testansatz Standards und Kontrollen mitgeführt werden, werden die absoluten Ergebnisse nicht von temperaturabhängigen Schwankungen der Extinktion beeinflusst. Wir empfehlen in jedem Falle das Mitführen einer zusätzlichen internen Kontrolle.

**Pipettierschema für den Anti-Spermatozoen-Antikörper ELISA**

	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	

In diesem Pipettierschema sind die empfohlenen Positionen für den Blank, die Standards (S1 – S4), die Kontrolle (PC) und die Patientenproben (P1 – P42) als Doppelbestimmungen dargestellt.

**13 AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE**

1. Berechnen Sie die durchschnittlichen Extinktionswerte für jeden Standardwert, sowie für die Kontrolle und für die Patientenproben.
2. Die Extinktion (y-Achse) von jedem Standardwert wird im Verhältnis zur zugehörigen Konzentration der anti-Spermatozoen Antikörper (x-Achse) graphisch dargestellt. Die daraus resultierende Kurve wird benutzt, um die Werte der Patientenproben zu bestimmen.
3. Den Extinktionen der Patientenproben werden durch Interpolation aus der Standardkurve korrespondierende anti-Spermatozoen Antikörper-Konzentrationen zugeordnet.

**14 BESCHRÄNKUNGEN DES TESTES**

Bei Temperaturen, die höher als 30 °C liegen, sollten die Proben gekühlt oder gefroren transportiert werden. Bei solchen Umgebungstemperaturen kann ggf. die Dauer der enzymatischen Farbreaktion verkürzt werden.

Schwer hämolytische oder lipämische Seren oder Seren von Patienten mit Leberkrankheiten sollten nicht verwendet werden. Auch durch andere Erkrankungen wie etwa poly- oder monoklonale Gammopathien, Autoimmunerkrankungen oder durch einen veränderten Immunstatus können die Ergebnisse beeinträchtigt werden.

**15 ERWARTETE WERTE**

Normalwerte: 0 – 60 Einheiten/mL

Erhöhte Werte: über 60 Einheiten/mL

Bei Ergebnissen des Testes nahe des cut-off (Bereich 55 – 65 Einheiten/mL) wird eine Wiederholung des Testes innerhalb von 14 Tagen empfohlen

**16 LEISTUNGSDATEN****1. Intraserielle Variationskoeffizienten:** 6,88% (5,90 – 7,81%)

Zur Bestimmung der intraserialen Variationskoeffizienten wurden sechs Kits von sechs verschiedenen Chargen, die an unterschiedlichen Tagen produziert wurden, verwendet.

Eine Patientenprobe (Extinktion über 1,0) wurde 96-mal pro Testdurchlauf verwendet.

**2. Interserielle Variationskoeffizienten:** 6,45% (4,84 – 7,52%)

Zur Bestimmung der interserialen Variationskoeffizienten wurde jeweils ein Streifen von 12 Kits, die von sechs verschiedenen, an unterschiedlichen Tagen produzierten Chargen stammten, verwendet.

Eine Patientenprobe (Extinktion über 1,0) wurde 72-mal pro Testdurchlauf verwendet.

## 1 IMPIEGO DEL TEST

Il Test Sperm Antibody ELISA è un test rapido, affidabile, semiquantitativo per la ricerca di anticorpi anti-spermatozoi umani. Questo test è utilizzabile su siero.

**Nota bene** : i termini “anticorpi anti-spermatozoi” , “anticorpi anti-sperma” e “anticorpi spermatici” sono equivalenti. In queste istruzioni per l’uso viene utilizzato il termine piuttosto lungo, ma corretto “anticorpi anti-spermatozoi”

## 2 SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi specifici per antigeni degli spermatozoi possono causare infertilità in donne e uomini. L’utilizzo del test Anticorpi Anti-Spermatozoi ELISA è raccomandato per la diagnosi di disordini alla fertilità di origine immunologica.

L’incapacità a procreare è un problema crescente che riguarda fino al 20 % di coppie in età riproduttiva in modo temporaneo o a lungo termine. Nel 20 % di questi casi si è evidenziata la presenza di anticorpi anti-spermatozoi nei pazienti di sesso maschile o femminile. (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

La definizione di infertilità secondo il WHO (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999) è l’assenza di concepimento per un periodo di 12 mesi di rapporti non protetti. La causa più importante di un disordine della fertilità di origine immunologica è la formazione di anticorpi contro antigeni degli spermatozoi.

Gli anticorpi anti-spermatozoi esercitano una serie eterogenea di effetti sulla capacità degli spermatozoi di fecondare. L’effetto inibitore degli anticorpi anti-spermatozoi sulla mobilità degli spermatozoi a causa del legame sulla loro superficie e i processi di agglutinazione è ben noto (Zouari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

La penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale è ostacolata dalla presenza di anticorpi anti-spermatozoi nel liquido seminale e/o nel muco cervicale (Eggert-Kruse W et al: Hum Reprod (1993) 8, 1025-31). Anticorpi anti-spermatozoi influenzano negativamente la capacitazione e la reazione acrosomiale degli spermatozoi e quindi impedisce la interazione degli spermatozoi con l’ovocita (Francavilla F et al: Front Biosci (1999): 1;4:9-25; Bohring C et al.: Hum Reprod (2001) 7:113-8).

L’interazione dello spermatozoo con l’ovocita e il successivo legame e penetrazione della zona pellucida possono essere inibiti da anticorpi anti-spermatozoi. Anche la fusione derivante dell’ovocita e dello spermatozoo può essere pregiudicata dalla presenza di anticorpi anti-spermatozoi (Mazumdar S et al.: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

Secondo Crosignani *et al.* (Crosignani *et al.*: PG et al.: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) la percentuale di gravidanze in coppie con anticorpi anti-spermatozoi nell’uomo o nella donna è del 38% inferiore a quella di gruppi di controllo. Inoltre è stata confermato un effetto sull’impianto dell’ovulo e sul primo sviluppo embrionale. E’ attualmente in discussione una relazione tra anticorpi anti-spermatozoi e aborto. La presenza di anticorpi anti-spermatozoi in coppie infertili ammonta al 20% (Lahteenmaki A et al.: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al.: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Gli anticorpi anti-spermatozoi possono essere presenti in soluzione nell’ejaculato o legati alla superficie degli spermatozoi. Gli anticorpi anti-spermatozoi possono ritrovarsi sia nell’uomo che nella donna (Clarke GN et al.: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). Nella donna gli anticorpi anti-spermatozoi possono trovarsi nel muco cervicale, nel liquido del dotto ovarico e nel liquido follicolare. Gli uomini con presenza di anticorpi anti-spermatozoi in oltre il 50% dei loro spermatozoi presentano un quoziente di fertilità notevolmente ridotto (Abshagen K et al.: Fertil Steril (1998) 70, 355-6).

## 3 SETTORI DI APPLICAZIONE

Il test Sperm Antibody ELISA può trovare applicazione nella pratica clinica per la diagnosi di infertilità di origine immunologica nell’uomo e nella donna.

#### 4 PRINCIPIO DEL METODO

Il test per anticorpi anti-spermatozoi ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) è un test immunoenzimatico sandwich "solid-phase" per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-spermatozoi in siero umano.

La micropiastra ELISA è rivestita da una miscela di proteine di spermatozoi che vengono riconosciute dagli anticorpi anti-spermatozoi. I campioni e gli standard sono pipettati nei pozzetti ed incubati. Nel corso dell'incubazione gli anticorpi anti-spermatozoi si legano alle proteine di spermatozoi e vengono quindi immobilizzati sulla piastra. Dopo il lavaggio si aggiunge il coniugato con l'enzima, che è costituito da anticorpi anti-globulina umana legati con legame covalente a perossidasi da rafano. Dopo l'eliminazione del coniugato non legato, effettuata attraverso il lavaggio, la perossidasi ossida il substrato aggiunto TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) dando luogo ad una reazione cromatica che viene bloccata dall'aggiunta di acido solforico ( $H_2SO_4$ ) 0.25 M. L'assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm con un lettore di micropiastre. Si raccomanda l'utilizzo di una lettura di riferimento alla lunghezza d'onda di  $\geq 550$  nm.

#### 5 REAGENTI

(sufficienti per 96 determinazioni)

1. Strisce di micropiastre rivestite da antigene spermatico	96 pozzetti
2. Anticorpi anti-sperma ELISA standard set - per vial	0.5 mL
- Standard 1 ( 31 U/mL – tappo incolore)	
- Standard 2 ( 62 U/mL – tappo bianco)	
- Standard 3 (125 U/mL – tappo giallo)	
- Standard 4 (250 U/mL – tappo blu)	
3. Controllo (tappo verde)	0.5 mL
4. Tampone di diluizione (da utilizzarsi anche come bianco / standard zero / 0 U/mL)	2 x 50 mL
5. Soluzione di lavaggio (concentrata 10x)	50 mL
6. Coniugato con enzima (pronto all'uso)	8 mL
7. Soluzione substrato (soluzione di TMB, pronto all'uso)	13 mL
8. Soluzione bloccante (0.25 mol/L $H_2SO_4$ )	13 mL
9. Supporti per strisce singole	1 x

#### 6 MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

1. Lettore per micropiastre con filtro a 450 nm, opzionale filtro di riferimento a  $\geq 550$  nm.
2. Micropipette con puntali a perdere: 5  $\mu$ L, 50  $\mu$ L e 500  $\mu$ L
3. Provette per la diluizione dei campioni
4. Acqua distillata o deionizzata
5. Carta assorbente.
6. Utilizzare solo pipette e strumenti calibrati

#### 7 ACCORGIMENTI E PRECAUZIONI

1. Questo kit è da utilizzarsi solo per uso in vitro.
2. Evitare ogni contatto con la soluzione bloccante, potrebbe causare irritazioni e bruciature alla pelle.
3. Non pipettare i reagenti con la bocca.
4. Tutti i campioni sono da considerarsi potenzialmente infetti e da trattare con la massima cura.
5. L'utilizzo e l'eliminazione del materiale del kit devono avvenire in accordo con le procedure di sicurezza per il rischio biologico previste nel paese di utilizzo e secondo le normative, dove esistano.

## 8 ISTRUZIONI PER LA PREPARAZIONE DEI REATTIVI

1. I componenti del kit sono da considerarsi un tutto unico e non devono essere scambiati con componenti di altri kit.
2. Portare tutti i reattivi e i campioni a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Mescolare i reagenti evitando la formazione di schiuma.
4. Una volta iniziata la procedura, tutti i passaggi successivi devono essere effettuati senza interruzioni.
5. Pipettare tutti i reagenti e campioni sul fondo dei pozzetti. Non è necessario mescolare o agitare dopo il pipettaggio.
6. Usare puntali nuovi per ogni campione.
  7. Prima di iniziare il test, tutti i reagenti da utilizzare devono essere preparati per un uso immediato, tutte le strisce necessarie già disposte negli appositi supporti, etc. Questo garantisce uguali periodi di tempo per ogni fase di pipettaggio senza interruzioni.
8. Per risultati ottimali è importante lavare accuratamente i pozzetti dopo l'incubazione e rimuovere ogni goccia residua di acqua di lavaggio picchiettando la piastra su carta assorbente o su tessuto.
9. Poiché la cinetica della reazione enzimatica dipende dalla temperatura esterna si possono ottenere estinzioni diverse correlate a differenti temperature ambiente. La temperatura ottimale in un laboratorio è 20 °C – 22 °C (68 °F – 72 °F).
10. Si raccomanda di effettuare tutti i test in doppio al fine di minimizzare le conseguenze di errori di pipettaggio o dispensazione dei reattivi.

## 9 CONSERVAZIONE DEL KIT E DURATA

1. Conservare i reagenti a 2 °C – 8 °C (36 °F – 46 °F).
2. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza del kit.
3. Richiudere i flaconi con i tappi immediatamente dopo l'uso.
4. Conservare le strisce della micropiastra in busta asciutta con essiccante. Le strisce rimanenti dopo l'uso vanno rimesse nella busta ben chiusa insieme con l'essiccante. In queste condizioni di conservazione, sono stabili almeno per 4 settimane dopo l'apertura della busta sigillata.

## 10 CAMPIONE

Siero

## 11 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Prelevare il sangue dalla vena, lasciare coagulare e separare il siero con centrifugazione a temperatura ambiente; evitare l'emolisi. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti. Conservare in provette chiuse per evitare contaminazioni o alterazioni nella concentrazione delle sostanze da testare.

Trattare tutti i campioni con la massima cura come potenzialmente infetti.

Non ci sono interferenze note con fattori esterni e altre sostanze.

I campioni possono essere conservati alle seguenti temperature e per i periodi sottoindicati:

Temperatura ambiente fino a 30 °C (86 °F):	fino a tre giorni
Temperatura di frigorifero (2 °C – 8 °C / 36 °F – 46 °F):	fino a una settimana
Temperatura di freezer di casa (-10 °C – -20 °C / 14 °F – -4 °F):	fino a un anno

Per la determinazione degli anticorpi anti-spermatozoi nel plasma seminale si prega di utilizzare il Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA (EIA-4249).

**ATTENZIONE!** Non ci sono test disponibili che possano garantire l'assenza dai reagenti del kit di virus dell'Epatite B, Virus di immunodeficienza umana (HIV/HTLV-III/LAV), o altri agenti infettivi. E' necessario quindi considerare come potenzialmente infetti tutti i derivati del sangue umano, inclusi i campioni dei pazienti.



**12 PROCEDIMENTO**

1. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente e mescolare accuratamente prima dell'uso.
2. Preparazione della soluzione di lavaggio (10x): Diluire la soluzione di lavaggio concentrata (50 mL) aggiungendo 450 mL di acqua distillata o deionizzata. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 4 settimane a temperatura di frigorifero (4 °C – 8 °C / 39 °F – 46 °F). Attenzione: non utilizzare acqua corrente!
3. Diluire i sieri 1: 100 con tampone di diluizione (diluizione 1:100 : 5 µL di siero + 495 µL di tampone).
4. Inserire il numero richiesto di pozzetti o strisce negli appositi supporti.
5. Pipettare 50 µL di standard negli appositi pozzetti.
6. Pipettare 50 µL di siero diluito con puntali disposable nuovi nei pozzetti previsti.
7. Incubare per 60 min a 37 °C. Consigliamo di utilizzare una camera umida.
8. Eliminare attentamente il contenuto dei pozzetti e risciacquare 3 volte con 200 µL di soluzione lavaggio diluita.
9. Eliminare l'acqua residua dai pozzetti picchiettandoli (tenuti nei supporti) su carta assorbente o tessuto.
10. Dispensare 50 µL di coniugato enzima in ogni pozzetto.
11. Incubare per 60 min a 37 °C. Consigliamo di utilizzare una camera umida.
12. Eliminare attentamente il contenuto dei pozzetti e risciacquare 5 volte con 200 µL di soluzione lavaggio diluita.
13. Eliminare l'acqua residua dai pozzetti picchiettandoli (tenuti nei supporti) su carta assorbente o tessuto.
14. Dispensare 50 µL di soluzione substrato immediatamente dopo il lavaggio di ciascun pozzetto.
15. Incubare per 30 min a temperatura ambiente
16. Interrompere la reazione enzimatica aggiungendo 50 µL of soluzione bloccante in ciascun pozzetto nell'ordine e con lo stesso intervallo di tempo impiegati per dispensare il substrato.
17. Misurare la estinzione dei campioni a 450 nm. Si raccomanda di effettuare la misura dell'estinzione entro 10 minuti dopo aver interrotto la reazione.

Come regola generale la reazione enzimatica è proporzionale in modo lineare al tempo e alla temperatura. Questo rende possibile l'interpolazione dei dati in condizioni chimico-fisiche fisse.

Poiché i calibratori sono dosati in ogni serie, le variazioni di assorbanza non influenzano i risultati assoluti. In ogni caso si raccomanda di utilizzare controlli interni addizionali, se disponibili.

**Schema di pipettaggio per il test**

	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

In questo schema di pipettaggio tutte le posizioni raccomandate per il bianco (utilizzare il tampone di diluizione incluso nel kit), gli standard (S1 – S4), i controlli positivi (PC) e i campioni dei pazienti (P1 – P42) sono previste in doppio.

### 13 CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare il valore medio delle assorbanze per ogni serie di standard di riferimento, controlli e campioni di pazienti.
2. La densità ottica di ogni standard è segnata come valore y (asse y), il valore corrispondente di anticorpi anti-spermatozoi è riportato come valore x (asse x). La curva di calibrazione risultante è utilizzata per determinare i valori dei campioni. I valori di OD dei campioni sono correlati con la concentrazione corrispondente di anticorpi antisperma per interpolazione.
3. Utilizzando il valore medio delle letture per ogni campione si determinano le concentrazioni di anticorpi anti-spermatozoi in U/mL dalla curva di calibrazione.

### 14 LIMITAZIONI DEL TEST

- A temperature superiori a 30 °C (86 °F) I campioni devono essere trasportati a bassa temperatura o refrigerati. Il tempo per fermare la reazione enzimatica con il bloccante potrebbe dover essere cambiato (accorciato).
- Sieri fortemente emolitici o lipemici di pazienti con malattie epatiche non devono essere utilizzati. I risultati possono subire interferenze da alcune condizioni patologiche, come gammopatie poli- e monoclonali, gammopatie, malattie autoimmuni, o status immunitario alterato.

### 15 VALORI ATTESI

Valori Normali: 0 – 60 U/mL

Valori Elevati: oltre 60 U/mL

In caso di valori vicini al cut-off (55-65 U/mL) si raccomanda una determinazione successiva usando un nuovo campione prelevato entro le due settimane successive.

### 16 PERFORMANCE DEL TEST

#### 1. Coefficiente di variazione intra-serie: 6.88% (5.90 – 7.81 %)

Per la determinazione del coefficiente di variazione intra-serie sono stati utilizzati 6 kit di 6 differenti lotti (prodotti in giorni differenti). Un campione di paziente (densità ottica circa 1.0) è stato dosato 96 volte per ogni serie analitica.

#### 2. Coefficiente di variazione inter-serie: 6.45% (4.84 – 7.52 %)

Per la determinazione del coefficiente di variazione inter-serie è stata utilizzata una striscia per ognuno di 12 kit provenienti da 6 lotti diversi (prodotti in giorni differenti). Un campione di paziente (densità ottica circa 1.0) è stato dosato 72 volte per ogni serie analitica.

## 1 NOMBRE Y FINALIDAD

El ELISA anticuerpo anti-espermatozoide es un ensayo fiable y cuantitativo para la determinación de anticuerpos dirigidos contra espermatozoides humanos. Este ensayo se ha diseñado para utilizarse con suero.

**Tener en cuenta:** los términos “anticuerpos anti-espermatozoide”, “anticuerpos anti-esperma” y “anticuerpos espermáticos” son equivalentes. En este manual se utiliza el término “anticuerpos anti-espermatozoide” que no es el mas usado pero es el correcto.

## 2 IMPORTANCIA CLÍNICA

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos de espermatozoides pueden causar infertilidad en mujeres y hombres. Se recomienda el uso del anticuerpo ELISA anti-espermatozoide para el diagnóstico de desórdenes de infertilidad provocados por auto inmunidad.

El no tener descendencia de manera no deseada es un problema en crecimiento con el que más del 20% de las parejas en edad reproductiva se enfrentan temporalmente o de manera más duradera. En el 20% de estos casos se detecta la presencia de anticuerpos anti-espermatozoide en el paciente masculino o femenino. (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

De acuerdo con la WHO (WHO Manual de laboratorio para el Examen de Semen Humano y la interacción del Semen y el mucus cervical, 1999), la definición de infertilidad es la ausencia de una concepción en 12 meses de relaciones sexuales sin protección. La principal causa de un desorden de infertilidad inmunológico es la formación de anticuerpos dirigidos contra antígenos espermáticos.

Los anticuerpos anti-espermatozoides ejercen efectos heterogéneos en la habilidad de los espermatozoides para fertilizar. Se conoce el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-espermatozoides en la movilidad de estos debido a su unión a la superficie y por procesos de aglutinación (Zouari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

La penetración de los espermatozoides en el mucus cervical se debilita en presencia de anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal y/o en el mucus cervical (Eggert-Kruse W et al: Hum Reprod (1993) 8, 1025-31). Los anticuerpos anti-espermatozoides producen una influencia negativa en la capacitación y en la reacción del acrosoma del espermatozoide y por ello impiden la interacción del espermatozoide con el oocito (Francavilla F et al: Front Biosci (1999): 1; 4:9-25; Bohring C et al.: Hum Reprod (2001) 7:113-8).

La interacción del espermatozoide con el oocito y la subsiguiente unión y la penetración de la zona pelúcida puede ser inhibida por los anticuerpos anti-espermatozoides. La subsiguiente fusión del oocito y el espermatozoide puede ser impedida también por la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides (Mazumdar S et al.: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

De acuerdo con Crosignani et al. (Crosignani et al.: PG et al.: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) la razón de embarazos en parejas con anticuerpos anti-espermatozoides por parte del hombre o la mujer es un 38% menor que los grupos control. Más aún, también se confirma una influencia en la implantación e en el desarrollo temprano del embrión. Se discute la asociación de anticuerpos anti-espermatozoides y el aborto espontáneo.

La frecuencia de anticuerpos anti-espermatozoides en parejas infértiles asciende al 20% (Lahteenmaki A et al.: Hum Reprod (1995) 10, 2824-28; Nagy ZP et al.: Hum Reprod (1995) 10, 1775-80).

Los anticuerpos anti-espermatozoides pueden aparecer disueltos en el eyaculado o unidos a la superficie de los espermatozoides. Pueden encontrarse en hombres y en mujeres (Clarke GN et al.: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). En mujeres, los anticuerpos anti-espermatozoides pueden encontrarse en el mucus cervical, en el líquido del oviducto y el líquido folicular. Los hombres que tienen más del 50% de sus espermatozoides recubiertos con anticuerpos anti-espermatozoides muestran una llamativa reducción de la razón de fertilidad (Abshagen K et al.: Fertil Steril (1998) 70, 355-6).

## 3 CAMPOS DE APLICACIÓN

El ELISA anti espermatozoide puede aplicarse en la práctica clínica para el diagnóstico de la infertilidad causada por inmunidad en hombres y mujeres.

#### 4 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El ELISA anticuerpo espermático (Ensayo de inmunoadsorción unido a enzimas) es un inmunoensayo unido a enzima en fase sólida tipo sándwich para la determinación cuantitativa de anticuerpos anti-espermatozoide en el suero humano.

La placa de ELISA está recubierta con una mezcla de proteínas espermáticas que son reconocidas por anticuerpos anti-espermatozoides. Las muestras y los estándares se pipetea en los pocillos y después se incuban. Durante esta incubación los anticuerpos anti-espermatozoides se unen a las proteínas espermáticas y produciéndose su inmovilización en la placa. Después de lavar, se añade el conjugado enzimático que consiste en anticuerpos que se encuentran covalentemente unidos a peroxidasa de rábano. Después de eliminar el conjugado no unido mediante lavado, la peroxidasa de rábano oxida su sustrato añadido TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) teniendo lugar una reacción coloreada que se para mediante la adición de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.25M. La extinción se mide a una longitud de onda de 450nm con un lector de microplacas. Se recomienda el uso de una medida de referencia a una longitud de onda >550nm.

#### 5 REACTIVOS

Suficientes para 96 determinaciones.

	Reactivos	Cantidad	Preparación
1.	Tiras de microplacas recubiertas con antígenos espermáticos	96 pocillos	
2.	<b>Estándares del ELISA anticuerpo Espermático</b> (Standard) – Estándar 1 ( 31 U/mL – tapa de rosca incolora) – Estándar 2 ( 62 U/mL – tapa de rosca blanca) – Estándar 3 (125 U/mL – tapa de rosca amarilla) – Estándar 4 (250 U/mL – tapa de rosca azul)	0.5 mL/vial	Listo para usar
3.	<b>Control</b> (tapa de rosca verde)	0.5 mL	Listo para usar
4.	<b>Tampón de Dilución</b> (Dilution Buffer) también usado como blanco / Estándar cero / 0 U/mL	2 x 50 mL	Listo para usar
5.	<b>Solución de lavado (10x)</b> (Wash Solution)	50 mL	Concentrado
6.	<b>Enzima conjugado</b> (Enzyme Conjugate)	8 mL	Listo para usar
7.	<b>Solución Sustrato</b> (Substrate Solution), solución de TMB	13 mL	Listo para usar
8.	<b>Solución de Parada</b> (Stop Solution), 0.25 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13 mL	Listo para usar
9.	<b>SopORTE</b> para tiras sencillas (Holder)	1 x	

#### 6 MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de Microplacas con filtro de 450nm, opcionalmente con un filtro de referencia de  $\geq 550$  nm.
2. Pipetas multicanal con puntas desechables: 5  $\mu$ L, 50  $\mu$ L y 500  $\mu$ L.
3. Tubos para la dilución de las muestras.
4. Agua destilada o desionizada.
5. Papel Absorbente.
6. Por favor, usar solamente pipetas e instrumentos calibrados.

#### 7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este kit se ha diseñado solo para uso *in vitro*.
2. Evitar contacto con la solución de parada, puede causar irritación y quemaduras.
3. No pipetear los reactivos con la boca.
4. Por favor, tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas y manejarlas con cuidado.
5. El manejo y la dispensación deben realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas o por las leyes, donde existan.

## 8 INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Los componentes de este kit se han diseñado para su uso como una unidad integral y no deben intercambiarse con otros kits.
2. Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarse.
3. Todos los reactivos han de mezclarse sin formar espuma.
4. Una vez se ha comenzado con el ensayo, deben realizarse todos los pasos sin interrupción.
5. Pipetear todos los reactivos y muestras al fondo de los pocillos. No se necesita mezclar o agitar después del pipeteo.
6. Utilizar puntas de pipeta nuevas para cada muestra.
7. Antes de comenzar el ensayo, todos los reactivos a utilizar deben prepararse y estar listos para su uso inmediato, todas las tiras necesarias deben estar aseguradas en el soporte, etc. Esto asegura períodos iguales para cada paso de pipeteo sin interrupciones.
8. Para tener resultados óptimos es importante lavar los pocillos completamente después de la incubación y eliminar hasta la última gota de agua mediante sacudida enérgica de la placa contra papel adsorbente o en un trapo.
9. Debido a que la cinética de la reacción enzimática depende de la temperatura, se pueden observar diferentes extinciones que se correlacionan con la temperatura ambiente correspondiente. Las temperaturas óptimas son 20 °C – 22 °C (68 °F – 72 °F).
10. Se recomienda realizar todos los ensayos por duplicado para minimizar las consecuencias de errores en el pipeteo o en el manejo.

## 9 INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO E INFORMACIÓN DE VIDA EN ESTANTERÍA

1. Almacenar todos los reactivos a 2 °C – 8 °C.
2. Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad del kit.
3. La solución de lavado diluida es estable durante 4 semanas a temperatura de nevera (4 °C – 8 °C).
4. Volver a poner las tapas a los viales inmediatamente después de su uso.
5. Almacenar las tiras de la microplaca en una bolsa seca con desecadores. Las tiras que quedan deben almacenarse en la bolsa cerrada con el desecante. Bajo estas condiciones de almacenamiento, son estables al menos durante 4 semanas después de abrir la bolsa sellada.

## 10 MATERIAL DE LAS MUESTRAS

### Suero

## 11 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoger la sangre mediante punción en la vena, permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente, evitar hemólisis. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. Almacenar los tubos cerrados ya que hay peligro de contaminación o alteración de la concentración.

1. Manejar todas las muestras con el mayor cuidado ya que pueden ser infecciosas.
2. No se conocen interferencias con factores extrínsecos u otras sustancias.
3. Las muestras deben almacenarse a diferentes temperaturas para las siguientes vidas medias:

- Temperatura ambiente hasta 30 °C:	hasta tres días
- Temperatura de Nevera (2 °C a 8 °C):	hasta una semana
- Temperatura de Congelador (-10 °C a -20 °C):	hasta un año

Para la determinación de anticuerpos anti-espermatozoides en plasma seminal, utilice nuestro Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA (EIA-4249).

**ATENCIÓN!** No hay ensayos disponibles que garanticen la ausencia en este kit del virus de la Hepatitis B, del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV/HTLV-III/LAV), u otros agentes infecciosos. Así pues, todos los productos procedentes de sangre humana, incluyendo las muestras de los pacientes, deben considerarse potencialmente infecciosos.

**12 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO**

1. Calentar todos los reactivos a temperatura ambiente y mezclarlos completamente antes de usarlos.
2. Preparación de la solución de lavado (10x):  
Diluir la solución de lavado concentrada (50 mL) mediante la adición de 450 mL de agua destilada o desionizada.  
**Atención:** No usar agua de grifo!
3. Diluir el suero 1:100 con el tampón de dilución (Dilución 1:100: 5 µL de suero + 495 µL de tampón de dilución).
4. Fijar el número requerido de pocillos recubiertos o tiras en el soporte.
5. Pipetear 50 µL de los estándares en los pocillos respectivos.
6. Pipetear 50 µL del suero diluido con puntas desechables nuevas en los pocillos respectivos.
7. Incubar durante 60 min a 37 °C. Se recomienda el uso de una cámara húmeda.
8. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos y después lavar los pocillos 3 veces con 200 µL de la solución de lavado diluida.
9. Eliminar el agua residual de los pocillos mediante sacudida enérgica de la placa contra papel absorbente o un trapo.
10. Dispensar 50 µL del enzima conjugado en cada pocillo.
11. Incubar durante 60 min a 37 °C. Se recomienda el uso de una cámara húmeda.
12. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos y después lavar los pocillos 5 veces con 200 µL de la solución de lavado diluida.
13. Eliminar el agua residual de los pocillos mediante sacudida enérgica de la placa contra papel absorbente o un trapo.
14. Dispensar 50 µL de la solución sustrato a cada pocillo inmediatamente después del lavado.
15. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
16. Parar la reacción enzimática mediante la adición de 50 µL de solución de parada a cada pocillo en el mismo orden e intervalo de tiempo que la dispensación del sustrato.
17. Medir la extinción de las muestras a 450 nm. Se recomienda llevar a cabo la medida de la extinción dentro de los 10 minutos tras la parada de la reacción.

Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura. Esto hace posible la interpolación para condiciones físico-químicas fijadas.

Ya que los calibradores se ensayan cada vez, las fluctuaciones de la absorbancia no afectan a los resultados absolutos. En cualquier caso, se recomienda encarecidamente el uso de un control interno adicional si se dispone de este.

**Esquema de pipeteo para el ELISA anticuerpo espermático**

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

En este esquema de pipeteo las posiciones recomendadas para los blancos (usar, por favor, el tampón de dilución incluido en este kit), estándares (S1 – S4), control positivo (PC) y para las muestras de los pacientes (P1 – P42) se muestran como determinaciones dobles.

### 13 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcular la absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. La densidad óptica (DO) del valor de cada estándar se dibuja como valor y (eje y), el valor correspondiente al anticuerpo anti-espermatozoide se dibuja como valor x (eje x). La curva de calibrado resultante se utiliza para la determinación de los valores en las muestras de los pacientes. Los valores de DO de las muestras de suero se correlacionan con el correspondiente valor de la concentración de anticuerpo espermático por interpolación.
3. Utilizando la absorbancia media de cada muestra se determina la correspondiente concentración de anticuerpo anti-espermatozoide en U/mL a partir de la curva estándar.

### 14 LIMITACIONES DEL ENSAYO

A temperaturas superiores a 30 °C (86 °F) las deben transportarse enfriadas o refrigeradas. El tiempo de parada de la reacción (color enzimático) puede tener que ajustarse (acortarse).

No debe utilizarse suero severamente hemolizado o lipémico o suero de pacientes con enfermedades de hígado. Los resultados pueden estar afectados severamente por ciertas condiciones patológicas, como gammapatías poli- y monoclonal, enfermedades auto inmunes o por un estado inmune alterado.

### 15 VALORES ESPERADOS

Valores normales: 0 – 60 U/mL

Valores elevados: por encima de 60 U/mL

En el caso de que un valor esté en el rango cerca del punto de corte (55 to 65 U/mL) se recomienda una segunda determinación utilizando una nueva muestra tomada en las siguientes dos semanas.

### 16 CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE

1. **Coefficiente de variación intraensayo:** 6.88% (5.90 – 7.81 %)

Para la determinación del coeficiente de variación intraensayo se utilizaron 6 kits de 6 lotes diferentes (producidos en días diferentes). Para probar el procedimiento se ensayó una muestra de paciente (densidad óptica sobre 1.0) 96 veces.

2. **Coefficiente de variación interensayo:** 6.45% (4.84 – 7.52 %)

Para la determinación del coeficiente de variación interensayo se utilizaron una tira de pocillos pertenecientes a 12 kits de 6 lotes diferentes (producidos en días diferentes). Para probar el procedimiento se ensayó una muestra de paciente (densidad óptica sobre 1.0) 72 veces por procedimiento de ensayo.

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité