



Инструкция пользователя



Антиспермальные антитела (в семенной жидкости) ИФА

REF EIA-4249

Σ 96 лунок

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения антиспермальных антител (в семенной жидкости) ИФА компании ДРГ – надежный количественный анализ для определения антител к сперматозоидам человека. Материалом исследования является семенная плазма.

2 КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Антитела к сперматозоидам человека могут стать причиной фертильности мужчины или женщины. Использование данного набора рекомендовано для диагностирования иммунологически обусловленных нарушений фертильности.

Нежелательная бездетность является возрастающей проблемой с которой сталкиваются 20% пар репродуктивного возраста временно или длительно. В 20% таких случаев обнаруживается присутствие антиспермальных антител у мужчины или женщины.

ВОЗ определяет бесплодие как отсутствие оплодотворения в течение 12 мес. незащищенных половых актов. Главная причина иммунологических нарушений фертильности это выработка антиспермальных антител к сперматозоидам.

Антиспермальные антитела оказывают различное воздействие на способность сперматозоидов к оплодотворению. Ингибирующий эффект антиспермальных антител на подвижность сперматозоидов выражается в связывания антител с поверхностью сперматозоида и агглютинацией.

Проникновению сперматозоидов в шейку матки (слизистая) нарушается антиспермальными антителами в семенной жидкости или в слизи шейки матки. Антиспермальные антитела негативно влияют на капацитацию и акросомную реакцию сперматозоидов таким образом препятствуют взаимодействию сперматозоидов с яйцеклеткой.

Взаимодействие сперматозоида с яйцеклеткой и последующее связывание и проникновение в зону пеллюцида могут быть ингибированы антиспермальными антителами. Последующее слияние сперматозоида и яйцеклетки также может быть нарушено антиспермальными антителами.

По сообщению Crosignani *et al.* число беременностей в парах с наличием антиспермальных антител на 38% ниже по сравнению с контрольной группой. Кроме того, подтверждено влияние на имплантацию и раннее эмбриональное развитие. Обсуждается связи антиспермальных антител и невынашивания.

Частота обнаружения антиспермальных антител у бесплодных пар примерно 20%.

Антиспермальные антитела могут находиться в эякуляте или быть связаны с поверхностью сперматозоидов. Обнаруживаются как у мужчин так и у женщин. У женщин обнаруживаются в слизи шейки матки, маточной трубы или фолликулярной жидкости.

3 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов для определения антиспермальных антител (в семенной жидкости) ИФА применяется в клинической практике для диагностики иммуногенного бесплодия, вызванного у мужчин.

4 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор реагентов для определения антиспермальных антител (в семенной жидкости) ИФА компании ДРГ – твердофазный иммуоферментный анализ для количественного определения антиспермальных антител в семенной плазме человека, основанный на принципе «сэндвича».

Микропланшет покрыт смесью спермальных протеинов, распознаваемых антиспермальными антителами. Образцы и стандарты вносятся в лунки и инкубируются. Во время инкубации антиспермальные антитела связываются со спермальными протеинами и таким образом фиксируются на плашке. После промывки добавляется ферментный конъюгат, состоящий из глобулинов к антигенам человека, ковалентно связанных с пероксидазой хрена. После удаления несвязанного конъюгата с помощью промывки пероксидаза хрена окисляет добавляемый субстрат ТМБ, что дает цветовую реакцию, которая прекращается добавлением стоп-раствора (0.25 М серная кислота). Интенсивность реакции измеряют при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере. Использование эталонного измерения с длиной волны 550 нм \geq рекомендуется.

5 РЕАГЕНТЫ

На 96 определений

Микротитровальные лунки покрытые антигеном спермы	96 лунок
Набор стандартов антиспермальных антител ИФА	
– Стандарт 1 (31 Ед/мл– бесцветный колпачок)	0.5
– Стандарт 2 (62 Ед/мл– белый колпачок)	мл/флакон
– Стандарт 3 (125 Ед/мл– желтый колпачок)	
– Стандарт 4 (250 Ед/мл – голубой колпачок)	
Контроль (зеленый колпачок) на 70-120 Ед/мл	0.5 мл
Буфер для разведения (так же используется как бланк- реагент / нулевой стандарт / 0 Ед/мл)	50 мл
Промывочный раствор (10х)	50 мл
Ферментный конъюгат	8 мл
Раствор субстрата (ТМВ)	13 мл
Стоп раствор (0.25 моль/л H ₂ SO ₄)	13 мл
Держатель для отдельных стрипов	1 х
Адгезивный лист	2 х

6 ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм, опционно с референтным фильтром >550 нм.
2. Микротитровальные пипетки со съёмными наконечниками: 5 мкл, 50 мкл и 500 мкл.
3. Пробирки для разведения образцов.
4. Дистиллированная или деионизированная вода.
5. Абсорбирующая бумага.
6. Использовать только калиброванные пипетки и инструменты.

7 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для диагностики in-vitro.
2. Избегать контакта со Стоп-раствором. Он может вызвать ожоги и раздражение кожи.
3. Не пипетировать ртом.
4. Относиться к образцам как к потенциально зараженным и обращаться с ними соответственно.
5. Обращение и утилизация отходов должны соответствовать нормативной документации, если она существует.

8 ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИГОТОВЛЕНИЮ РЕАГЕНТОВ

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

9 ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ РЕАГЕНТОВ.

1. Хранить реагенты при 2°C – 8°C
2. Реагенты стабильны до даты срока годности
3. Сразу после использования плотно закрывать флаконы с реагентами.
4. Хранить микротитровальные стрипы в герметичной упаковке с влагопоглотителем. Оставшиеся стрипы хранить в плотно закрытой упаковке с влагопоглотителем. при соблюдении условий хранения стрипы стабильны по меньшей мере 4 недели после вскрытия упаковки.
5. Разведенный промывочный раствор стабилен 4 недели при хранении в холодильнике (4°C – 8°C).

10 МАТЕРИАЛ ОБРАЗЦА

Семенная плазма

11 ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

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

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

- | | |
|---|--------------|
| - при температуре до 30°C: | до трех дней |
| - в холодильнике (2– 8°C): | до 1 недели |
| - в бытовом морозильнике (-10°C – -20°C): | до 1 года |

Внимание!!!

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

12 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Довести все реагенты до комнатной температуры и тщательно перемешать.
2. Приготовление промывочного раствора (10х): развести концентрированный промывочный раствор (50 мл) добавив 450 мл дистиллированной или деионизированной воды. Разведенный промывочный раствор стабилен 4 недели при температуре (4 °C – 8 °C). **Внимание:** не использовать неочищенную водопроводную воду!
3. Развести семенную плазму **1: 5 (1+4)** буфером для разведения (разведение: 100 мкл семенной плазмы + 400 мкл буфера для разведения).
4. Установить необходимое количество лунок в держатель.
5. Добавить по **50 мкл** стандартов в соответствующие лунки.
6. Добавить по **50 мкл** разведенной семенной плазмы (используя новые наконечники) в соответствующие лунки.
7. Инкубировать **60 минут при 37 °C**. **Рекомендуется использование увлажнительной камеры или при отсутствии используйте адгезивную фольгу, поставляемую в наборе.**
8. Резко вытряхнуть содержимое лунок и промыть лунки три раза 200 мкл разведенного промывочного раствора.
9. Вытряхнуть остатки воды из лунок, постучав (в держателе) по поверхности покрытой впитывающей бумагой или тканью.
10. Раскапать по **50 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку.
11. Инкубировать **60 минут 37 °C**. **Рекомендуется использование увлажнительной камеры или при отсутствии используйте адгезивную фольгу.**
12. Резко вытряхнуть содержимое лунок и промыть лунки **5** раз по 200 мкл разведенного промывочного раствора.
13. Вытряхнуть остатки воды из лунок, постучав (в держателе) по поверхности покрытой впитывающей бумагой или тканью.
14. Раскапать по **50 мкл** раствора субстрата в каждую лунку сразу после промывки.
15. Инкубировать **30 минут при комнатной температуре**.
16. Остановить ферментативную реакцию добавлением **50 мкл** стоп-раствора в каждую лунку в той же

последовательности, в которой добавлялся субстрат.

17. Измерить поглощение образцов при **450 нм** в не позднее чем через 10 минут после остановки реакции.

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

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

Схема пипетирования

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

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

13 ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

14 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

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

15 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

нормальные значения: 0 – 60 Ед/мл
повышенные значения: свыше 60 Ед/мл

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

16 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Для определения коэффициента внутренней вариации использовались 6 наборов 6 различных партий (с разными датами производства). Один образец пациента использовался 96 раз (ОП= 1.0) за 1 постановку.

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

Для определения коэффициента внешней вариации использовалось по 1 стрипу из 12 наборов из шести различных партий (с разными датами производства). Один образец пациента использовался 72 раза (ОП= 1.0) за 1 постановку.