

## Návod k použití

# Protilátky proti Spermiím ELISA

Kat.č.: BS-10-20

Počet testů: 96  
Skladování: 2°C – 8°C (36°F – 46°F)

ELISA souprava ke zjištění protilátek působících proti antigenu Spermií v séru

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*

**CE** EU Registrační číslo: DE/CA80/IVD1697

**DIN EN ISO 13485**  
**DIN EN ISO 9001:2000**

Číslo registrace: CE 0483-0215, certifikováno mdc

**BIOSERV**  
**DIAGNOSTICS**  
[www.bioserv-diagnostics.com](http://www.bioserv-diagnostics.com)

BIOSERV Diagnostics GmbH  
Dr.Lorenz Weg 1, 18059 Rostock, Německo  
Telefon.: +49 381 40 587-6  
Fax: +49 381 40 587-77  
E-mail: [info@bioservdiagnostics.com](mailto:info@bioservdiagnostics.com)

**Nabídka diagnostických souprav BIOSERV Diagnostics GmbH:**

<b>Gastroenterologie</b>	<b>Objednací kód</b>	<b>Počet testů</b>
Lidská pankreatická Elastáza ELISA (nedostatečnost pankreatu)	BS-86-01	96
Pankrin TM ELISA (akutní pankreatitida)	BS-86-02	96
<b>Infertilita</b>		
Latex-aglutinační test na Protilátky proti spermiím	BS-10-10	50
ELISA test na Protilátky proti spermiím v krevním séru	BS-10-20	96
ELISA test na Protilátky proti spermiím v semenné plazmě	BS-10-21	96
Hemaglutinační test na Protilátky proti spermiím	BS-10-30	40
ELISA test na Protilátky proti spermiím – Ig klasifikace v séru	BS-10-50	96
Latex-aglutinační test na Protilátky proti Spermiím	BS-20-10	50
ELISA test na Protilátky proti Spermiím	BS-20-20	96
Hemaglutinační test na Protilátky proti Spermiím	BS-20-30	40
ELISA test na Protilátky proti Spermiím - Ig klasifikace	BS-20-50	96
Latex-aglutinační test na Protilátky proti ovariu	BS-40-10	50
ELISA test na Protilátky proti ovariu	BS-40-20	96
Hemaglutinační test na Protilátky proti ovariu	BS-40-30	40
ELISA test na Protilátky proti ovariu - Ig klasifikace	BS-40-50	96
<b>Monitorování rizikových těhotenství</b>		
IGF-BP1 ELISA (PP12)	BS-30-10	96
Glykodelin ELISA (PP14)	BS-30-20	96
<b>Hormony, Tumorové Markery</b>		
AFP ELISA	BS-90-21	96
FSH ELISA	BS-85-21	96
HCG ELISA kompletní molekula	BS-85-22	96
HPL ELISA	BS-85-24	96
LH ELISA	BS-85-23	96
Prolaktin ELISA	BS-85-25	96

---

### Účel použití

ELISA test na stanovení protilátek proti spermiiím firmy BIOSERV Diagnostics, je spolehlivý a kvantitativní test sloužící ke zjišťování protilátek proti spermiiím. Tento test je určen k vyšetření vzorků krevního séra.

**Upozornění:** výrazy „protilátky proti spermiiím“, „anti-spermiové protilátky“ a „spermiové protilátky“ mají stejný význam. V těchto instrukcích je používán termín „protilátky proti spermiiím“.

---

### Klinický význam

Protilátky působící proti antigenům spermiií mohou způsobit neplodnost u žen nebo u mužů. ELISA test Protilátky proti spermiiím od BIOSERV Diagnostics se doporučuje použít k diagnostikování imunologicky zapříčiněných poruch plodnosti.

Nechtěná bezdětnost je narůstající problém, se kterým je dočasně či dlouhodobě konfrontováno až 20% všech párů v reprodukčním věku. Ve 20% těchto případů existuje u ženských nebo mužských pacientů přítomnost protilátek proti spermiiím (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1955) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1955) 10, 1775-80).

Podle WHO (WHO Manuál pro vyšetřování lidského semena a interakce semena a hlenu děložního krčku, 1999), je neplodnost definována jako absence početí v průběhu 12ti měsíců nechráněného pohlavního styku. Hlavní příčinou poruchy imunologické plodnosti je tvorba protilátek působících proti antigenům spermiií. Protilátky proti spermiiím vyvíjejí heterogenní účinky na oplodňovací schopnost spermiií. Blokační efekt protilátek proti spermiiím a jejich pohyblivost, vázáním se na jejich povrch a aglutinačními procesy, je velmi dobře znám. (Zoufari R et al: Fertil Steril (1993) 59, 606-12).

Pronikání spermiií do hlenu děložního čípku je narušeno přítomností protilátek proti spermiiím v semenné plazmě a/nebo v hlenu děložního čípku (Eggrt-Kruse W et al.: Hum Reprod (1993) 8, 1025-31). Protilátky proti spermiiím negativně ovlivňují kapacitační a akrozomální reakci spermiií a brání tak interakci spermie s oocytem (Francavilla F et al: Front Biosci (1999): 1; 4:9-25; Bohring C et al.: Hum Reprod (2001) 7:113-8).

Interakce spermie s oocytem a následné spojení a penetrace Zony pellucidy může být protilátkami proti spermiiím potlačena. Následné spojení oocytu a spermie může být také narušeno přítomností protilátek proti spermiiím (Mazumdar S et al.: Fertil Steril (1998) 70, 799-810; Kutteh WH: Hum Reprod, (1999) 14, 2426-9).

Podle Crosignani et al. (Crosignani et al.: PG et al.: Hum Reprod (1998) 13, 2025-32) počet těhotenství u párů s protilátkami proti spermiiím u muže nebo ženy jsou v porovnání s kontrolními skupinami o 38% nižší. Dále pak mohl být potvrzen vliv na implantaci a časný embryologický vývoj. Spojitost mezi protilátkami proti spermiiím a samovolným potratem se diskutuje. Výskyt protilátek proti spermiiím u neplodných párů činí 20% (Lahteenmaki A et al: Hum Reprod (1955) 10, 2824-28; Nagy ZP et al: Hum Reprod (1955) 10, 1775-80).

Protilátky proti spermiiím se mohou vyskytovat volně v ejakulátu anebo vázané na povrch spermie. Protilátky proti spermiiím mohou být nalezeny u mužů a u žen (Clarke GN et al: Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7). U žen mohou být protilátky proti spermiiím nalezeny v hlenu děložního čípku, v tekutině vejcovodu a ve folikulární tekutině. Muži mající víc jak 50% svých spermiií potažených protilátkami proti spermiiím, vykazují zřetelně sníženou plodnost. (Abshagen K et al.: Fertil Steril (1998) 70, 355-6).

---

### Oblast použití soupravy

ELISA test na protilátky proti *Spermiiím* firmy BIOSERV Diagnostics může být v klinické praxi použit k diagnostikování imunologicky zapříčiněných poruch plodnosti.

---

### Princip metody

ELISA test na protilátky proti *Spermiiím* firmy BIOSERV Diagnostics je enzymatická imunoanalýza sendvičového typu sloužící ke kvantitativnímu zjištění protilátek proti *Spermiiím* v lidském krevním séru.

Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy směsí proteinů *Spermiií*. Vzorky a standardy jsou pipetovány do jamek a během inkubace se protilátky proti *Spermiiím* vážou k proteinům *Spermiií* a díky tomu jsou pak imobilizovány na destičce. Po promytí jamek je přidán enzymatický konjugát skládající se z polyklonálních protilátek proti lidským imunoglobulinům značených křenovou peroxidázou. Po inkubaci a promytí je z jamek odstraněn nevázaný konjugát. Následně přidáný substrát TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidin) oxiduje křenovou peroxidázu a přitom vyvolává barevnou reakci. Ta je zastavena přidáním 0.25 M kyseliny sírové (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Extinkce je měřena při vlnové délce 450 nm pomocí ELISA readeru. Doporučuje se referenční měření při vlnové délce ≥ 550 nm.

**Reagencie obsažené v soupravě (dostačuje pro 96 stanovení)**

1. Mikrotitrační stripy potažené antigenem <i>Spermiiim</i>	96 jamek
2. Sada standardů - v 1 lahvičce	0.5 ml
- Standard 1 ( 31 U/ml - bezbarvé šroubovací víčko)	
- Standard 2 ( 62 U/ml - bílé šroubovací víčko)	
- Standard 3 (125 U/ml - žluté šroubovací víčko)	
- Standard 4 (250 U/ml - modré šroubovací víčko)	
3. Kontrola (zelené šroubovací víčko)	0.5 ml
4. Ředící pufr (používaný též jako blank / nulový standard / 0 U/ml)	50 ml
5. Promývací roztok (10x koncentrovaný)	50 ml
6. Enzymový konjugát (k přímému použití)	5 ml
7. Substrátový roztok (TMB roztok, k přímému použití)	13 ml
8. Stop roztok (0.25 mol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	12 ml
9. Držák na mikrotitrační stripy	1 ks

**Další potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky:**

1. ELISA reader s filtrem 450 nm, popřípadě s referenčním filtrem  $\geq 550$  nm
2. ELISA promývačka
2. Automatické pipety s jednorázovými špičkami objemů 5  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 500  $\mu$ l
3. Zkumavky pro ředění vzorků
4. Destilovaná nebo deionizovaná voda
5. Absorpční papír
6. Používejte pouze kalibrované pipety a nástroje

**Upozornění a bezpečnostní opatření**

1. Souprava je určena pouze pro *in vitro* použití
2. Vyvarujte se kontaktu se Stop roztokem, může způsobit na kůži podráždění a popálení.
3. Reagencie nepipetujte ústy.
4. Považujte všechny vzorky za potencionálně infekční a zacházejte s nimi proto s nejvyšší opatrností.
5. Manipulace a likvidace by měly být v souladu s postupy, které jsou v souvislosti s biologickými rizikovými látkami definovány příslušnými národními bezpečnostními předpisy či regulacemi.

**Příprava reagií**

1. Komponenty v této soupravě jsou určeny k použití jako jeden celek a neměly by být vzájemně vyměňovány s komponenty jiných souprav.
2. Všechny reagencie a vzorky musí před použitím dosáhnout laboratorní teplotu.
3. Všechny reagencie je třeba promíchat bez vytvoření pěny.
4. Jakmile započne testovací proces, všechny další kroky musí být prováděny bez přerušení.
5. Pipetujte všechny reagencie a vzorky na dno jamek. Nemíchejte nebo netřepejte po pipetování.
6. Pro každý vzorek použijte novou jednorázovou špičku.
7. Před započtením testu musí být všechny potřebné reagencie připraveny k okamžitému použití, všechny potřebné stripy musí být vloženy do rámečku atd. Toto zaručí stejný časový interval pro každý pipetovací krok, a to bez přerušování.
8. Pro optimální výsledek je nezbytné důkladně umýt jamky po inkubaci a odstranit i tu poslední kapku vody tím, že destičkou obrácenou dnem vzhůru jemně klepnete na absorpční papír nebo tkaninu.
9. Vzhledem k tomu, že kinetika enzymatické reakce závisí na okolní teplotě, mohou být pozorovány rozdílné extinkce korelující s příslušnou teplotou místnosti. Optimální teplota laboratorní místnosti je 20-22°C (68-72°F).
10. Doporučuje se provádět všechny testy ve dvojím stanovení, aby byly minimalizovány důsledky chyb při pipetování či manipulaci.

---

### Skladování a doba použitelnosti

1. Reagencie uchovávejte při teplotě 2-8°C (36-46°F)
2. Uzavřené reagencie jsou stabilní až do doby použitelnosti uvedené na štítku soupravy.
3. Lahvičky po použití okamžitě uzavřete, nezaměňujte uzávěry.
4. Uchovávejte mikrotitrační stripy v suchém sáčku s vysoušedlem. Zbývající stripy musí být skladovány v dobře uzavřeném sáčku. Takto uchovávané jsou stabilní 4 týdny od otevření sáčku.

**POZOR! Jednou otevřené reagencie jsou stabilní maximálně po dobu 4 týdnů od jejich otevření.**

---

### Vzorky

Souprava je určena pro vyšetření krevního séra

---

### Odběr a příprava vzorků

Odeberte žilní krev, nechte ji srazit, a při laboratorní teplotě oddělte centrifugací sérum; vyvarujte se hemolýzy. Vyvarujte se rovněž opakovanému zmrazování a rozmrazování. Uchovávejte zkumavky uzavřené, abyste se předešli možné kontaminaci nebo změně koncentrace.

1. Manipulujte se všemi vzorky s nejvyšší opatrností, mohou být infekční.
2. Nejsou známy žádné interference s vnějšími faktory či jinými substancemi.
3. Vzorky mohou být skladovány za různých teplot v následujících časových rozmezích:

- Teplota okolního prostředí až do 30°C (86°F):	t ři dny
- Teplota v lednici (2-8°C / 36°F – 46°F):	jeden týden
- Teplota domácí mrazničky (-10°C až -20°C/14°F až -4°F):	jeden rok

Chcete-li stanovovat protilátky v seminální plasmě použijte soupravu BS-10-21 – Antispermatické protilátky v semenné plasmě ELISA .

**POZOR! Neexistují žádné testovací metody, které by zaručily, že v reagentech v této soupravě není přítomen virus Hepatitidy B, virus HIV (HIV/HTLV-III/LAV), či jiné infekční substance. Z tohoto důvodu by měly být všechny produkty z lidské krve, včetně patientských vzorků, považovány za potencionálně infekční.**

---

### Postup stanovení

1. Nechejte všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu a před použitím důkladně promíchejte.
  2. Příprava promývacího roztoku (10x): Naředte koncentrovaný promývací roztok (50 ml) přidáním 450 ml deionizované vody. Zředěný promývací roztok zůstává stabilní po 4 týdny při teplotách 2-8°C / 39-46°F.
- Pozor: Používejte destilovanou nebo deionizovanou vodu!**
3. Sérum zředte v poměru 1:100 ředícím puřem (ředění 1:100 -> 5 µl séra + 495 µl ředícího puřru).
  4. Vložte požadovaný počet jamek nebo celých stripů do rámečku.
  5. Pipetujte 50 µl standardů do příslušných jamek.
  6. Vždy novou jednorázovou špičkou pipetujte 50 µl naředěného séra do příslušných jamek.
  7. Inkubujte 60 minut při teplotě 37°C.
  8. Rázně vytřepněte obsah jamek a 3x je promyjte 200 µl pracovního ředění promývacího roztoku.
  9. Odstraňte zbývající vodu z jamek tím, že jimi jemně klepnete (v držáku) na absorpční papír nebo tkaninu.
  10. Do všech jamek pipetujte 50 µl konjugátu.
  11. Inkubujte 60 minut při teplotě 37°C.
  12. Rázně vytřepněte obsah jamek a jamky 5x promyjte 200 µl naředěného promývacího roztoku.
  13. Odstraňte zbývající vodu z jamek tím, že jimi jemně klepnete (v držáku) na absorpční papír nebo tkaninu.
  14. Po promytí ihned do každé jamky napipetujte 50 µl roztoku substrátu.
  15. Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
  16. Zastavte enzymovou reakci přidáním 50 µl Stop roztoku do každé jamky, v tom samém pořadí a času jako u substrátového roztoku.
  17. Měřte extinkci vzorků při 450 nm. Doporučuje se provést měření extinkce během 10ti minut od zastavení reakce.

**Poznámka:** Všeobecně platí, že enzymatická reakce je přímo úměrná času a teplotě. Interpolace je tak možná v pevně stanovených fyzikálně chemických podmínkách. Vzhledem k tomu, že kalibrátory jsou stanovovány v každém běhu, výkyvy absorbance neovlivňují absolutní výsledky.

---

### Doporučené schéma pipetování

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
BLANK	BLANK	P	3	P	11	P	19	P	27	P	35	A
S1	S1	P	4	P	12	P	20	P	28	P	36	B
S2	S2	P	5	P	13	P	21	P	29	P	37	C
S3	S3	P	6	P	14	P	22	P	30	P	38	D
S4	S4	P	7	P	15	P	23	P	31	P	39	E
PK	PK	P	8	P	16	P	24	P	32	P	40	F
P	1	P	9	P	17	P	25	P	33	P	41	G
P	2	P	10	P	18	P	26	P	34	P	42	H

V tomto pipetovacím schématu jsou znázorněny doporučené pozice pro prázdné jamky (použijte prosím ředící pufr obsažený v této soupravě), standardy (S1-S4), pozitivní kontrolu (PK) a pro testované vzorky (P1-P42), stanovované v dubletu.

### Výpočet výsledků

1. Vypočítejte průměrné hodnoty absorbance standardů, kontrol a testovaných vzorků.
2. Naměřenou absorbancí každého standardu zaneste na osu y, odpovídající hodnotu koncentrace protilátek proti *Spermiiim* pak na osu x. Výslednou kalibrační křivku použijte k určení hodnoty koncentrace protilátek v testovaných vzorcích. Hodnoty OD vzorků séra korelují s odpovídající hodnotou koncentrace protilátek proti *Spermiiim*.
3. Ze sestrojené kalibrační křivky odečtěte adekvátní koncentrace protilátek proti *Spermiiim* v U/ml odpovídající naměřeným průměrným hodnotám absorbance každého vzorku.

### Limitace stanovení

- Při teplotách vyšších než 30°C (86°F) by měly být vzorky transportovány chlazené nebo zmrazené. Čas zastavení enzymatické reakce (doba poslední inkubace) může být přizpůsoben (zkrácen).
- Silně hemolytická nebo lipemická séra nebo séra od pacientů s jaterními chorobami by neměla být používána. Výsledky mohou být nepříznivě ovlivněny určitými patologickými stavy jako například polyklonální nebo monoklonální gamapatií, autoimunní chorobou nebo změněným stavem imunity.

### Předpokládané hodnoty

Normální hodnoty: 0-60 U/ml

Zvýšené hodnoty: nad 60 U/ml

### Charakteristiky stanovení

1. *Variační koeficient intra-stanovení: 6.88% (5.90-7.81%)*

Pro určení variačního koeficientu intra-stanovení bylo použito 6 souprav z různých výrobních šarží. Jeden vzorek pacienta (optická hustota přibližně 1.0) byl použit v testovací proceduře 96x.

2. *Variační koeficient inter-stanovení: 6.45% (4.84-7.52%)*

Pro určení variačního koeficientu inter-stanovení byl použit vždy jeden proužek z celkem 12ti souprav pocházejících z 6ti různých výrobních šarží. Jeden vzorek pacienta (optická hustota přibližně 1.0) byl použit v testovací proceduře 72x.

### Kontakt na dodavatele:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78b, 612 00 Brno

T: 541 243 113, F: 541 243 114,

E: [laboserv@laboserv.cz](mailto:laboserv@laboserv.cz), [objednavky@laboserv.cz](mailto:objednavky@laboserv.cz)

[www.laboserv.cz](http://www.laboserv.cz)

[www.lshop.cz](http://www.lshop.cz)