

## Návod k použití

# Protilátky proti Zona Pellucida ELISA

Kat.č.: BS-20-20

Počet testů: 96

Skladování: 2°C – 8°C (36°F – 46°F)

Na enzymy vázané imunosorbentní stanovení (ELISA) ke zjištění protilátek působících proti antigenu *Zona Pellucida* v séru, děložní tekutině a folikulárních lavážích

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*

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

Řídicí systém certifikované kvality podle

**DIN EN ISO 9001:2000**

Číslo registru: IC 373 038, certifikováno ifta-CERT

**DIN EN ISO 13485**

Číslo registru: 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 Zona Pellucida       | BS-20-10             | 50                 |
| ELISA test na Protilátky proti Zona Pellucida                   | BS-20-20             | 96                 |
| Hemaglutinační test na Protilátky proti Zona Pellucida          | BS-20-30             | 40                 |
| ELISA test na Protilátky proti Zona Pellucida - 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 protilátky proti *Zona Pellucida* firmy BIOSERV Diagnostics, je spolehlivý a kvantitativní test sloužící ke zjišťování protilátek proti *Zona Pellucida*. Tento test je určen k použití se sérem.

**Klinický význam**

Protilátky působící proti antigenům *Zona Pellucida* mohou u žen způsobit neplodnost. Test na protilátky proti *Zona Pellucida* ELISA od BIOSERV Diagnostics se doporučuje použít k diagnostikování imunologicky zapříčiněných poruch plodnosti.

**Oblast použití soupravy**

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

**Princip metody**

ELISA test na protilátky proti *Zona Pellucida* firmy BIOSERV Diagnostics je enzymatická imunoanalýza sendvičového typu sloužící ke kvantitativnímu zjištění protilátek proti *Zona Pellucida* v lidském krevním séru. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy směsí proteinů *Zona Pellucida*. Vzorky a standardy jsou pipetovány do jamek a následně inkubovány. Během inkubace se protilátky proti *Zona Pellucida* vážou k proteinům *Zona Pellucida* a díky tomu jsou pak imobilizovány na destičce. Po promytí jamek je přidán enzymatický konjugát skládající se z polyklonálních protilátek proti Fc epitopu lidských imunoglobulinů značených křenovou peroxidázou. Promytím 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 proužky potažené antigenem <i>Zona Pellucida</i>    | 96 jamek |
| 2. Sada standardů - v 1 lahvičce                                     | 0.5 ml   |
| - Standard 1 ( 6 U/ml - bezbarvé šroubovací víčko)                   |          |
| - Standard 2 ( 25 U/ml - bílé šroubovací víčko)                      |          |
| - Standard 3 ( 50 U/ml - žluté šroubovací víčko)                     |          |
| - Standard 4 (100 U/ml - modré šroubovací víčko)                     |          |
| 3. Kontrola (zelené šroubovací víčko) rozmezí 15-60 U/ml             | 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 proužky                                    | 1 ks     |

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

1. ELISA reader s filtrem 450 nm, popřípadě s referenčním filtrem ≥ 550 nm
2. Automatické pipety s jednorázovými špičkami objemů 5 µl, 50 µl, 100 µl a 1000 µl
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 potenciálně 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 reagensí

1. Komponenty v této soupravě jsou určeny k použití jako jeden celek a neměly by být vzájemně vyměňovány s komponenty jiných souprav.
2. Všechny reagensie a vzorky musí před použitím dosáhnout laboratorní teplotu.
3. Všechny reagensie je třeba promíchat bez vytvoření pěny.
4. Jakmile započne testovací proces, všechny další kroky musí být prováděny bez přerušení.
5. Pipetujte všechny reagensie 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 reagensie připraveny k okamžitému použití, všechny potřebné proužky 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. Reagensie uchovávejte při teplotě 2-8°C (36-46°F)
2. Uzavřené reagensie 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 reagensie jsou stabilní maximálně po dobu 4 týdnů od jejich otevření.**

---

### Vzorky

Souprava je určena pro vyšetření krevního séra, děložní tekutiny a folikulárních laváží.

---

### 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 mezích:

|   |             |
|---|-------------|
| - Teplota okolního prostředí až do 30°C (86°F):           | tři 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 děložní tekutině nebo ve folikulárních laváží, informujte se prosím o platném postupu.

**POZOR!** Neexistují žádné testovací metody, které by zaručily, že v reagensích 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 potenciálně infekční.

**Postup stanovení**

1. Nechejte všechny reagensy 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: Nepoužívejte nečistěnou vodu z vodovodního kohoutku!**
3. Sérum zředte v poměru 1:100 ředícím pufrům (ředění 1:100 -> 5 µl séra + 495 µl ředícího pufru).
4. Vložte požadovaný počet jamek nebo proužků 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 vytřepte 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 vytřepte 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.

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 |  |
|---|-------|-------|---|----|---|----|---|----|---|----|----|----|--|
| 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 |  |

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 dubletně.

**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 *Zona Pellucida* 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 *Zona Pellucida*.
3. Ze sestavené kalibrační křivky odečtěte adekvátní koncentrace protilátek proti *Zona Pellucida* 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: 0-10 U/ml

Zvýšené hodnoty: nad 10 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: 6.51% (5.40-8.70%)*

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)