



SPERM-ANTIBODY- ELISA

KAPD1826

LOT : 160222/1



SPERM ANTIBODY ELISA

en

KAPD1826

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 NAME AND INTENDED USE

The Sperm Antibody ELISA is a reliable and quantitative test for the determination 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 from DIASource 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 DIASource 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 DIASource 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 calibrators 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 (H₂SO₄). The extinction is measured at a wavelength of 450 nm with a microplate reader. The use of a reference measurement with a wavelength ≥ 550 nm is recommended.

5 REAGENTS

- | |
|----|
| UU |
|----|

Microtiter strips coated with sperm antigen
96 wells
- | | |
|-----|---|
| CAL | N |
|-----|---|

 N=1 to 4
4 vials, 0.5 ml
Calibrator 1 (31 U/ml) – colourless screw cap
Calibrator 2 (62 U/ml) – white screw cap
Calibrator 3 (125 U/ml) – yellow screw cap
Calibrator 4 (250 U/ml) – blue screw cap
- | | |
|----|-----|
| Ab | HRP |
|----|-----|

 Enzyme Conjugate
1 vial, 8 ml
ready to use
- | | |
|-----|-----|
| DIL | BUF |
|-----|-----|

 2 vials, 50 ml/vial
Also used as blank / zero calibrator 0 U/ml
- | | |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

 1 vial, 13 ml
Ready to use
Solution of TMB
- | | |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

 1 vial, 13 ml
Contains 0.25M H₂SO₄
- | | | |
|------|------|------|
| WASH | SOLN | CONC |
|------|------|------|

 1 vial, 50 ml (10X concentrated)
- | | |
|---------|---|
| CONTROL | N |
|---------|---|

 N=1, 1 vial, 0.5 ml (green screw cap)
- Holder for single strips 1 x

6 MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- Microplate reader with 450 nm filter, optionally with a reference filter ≥ 550 nm.
- Microliter pipettes with disposable tips: 5 μ l, 50 μ l and 500 μ l.
- Tubes for the dilution of the samples
- Distilled or deionised water
- Absorbent paper.
- Please use only calibrated pipettes and instruments.
- Incubator at 37°C.

7 WARNING AND PRECAUTIONS

- This kit is intended for *in vitro* use only.
- Avoid contact with the stop solution, it may cause skin irritations and burns.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Please regard all samples as potentially infectious and handle them with utmost care.
- 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

- The components of this kit are intended for use as an integral unit and should not be interchanged with the components of other kits.
- All reagents and specimens must be brought to room temperature before use.
- All reagents have to be mixed without foaming.
- Once the test procedure has been started, all steps should be continued without interruption.
- Pipette all reagents and samples onto the bottom of the wells. Mixing or shaking after pipetting is not required.
- Use new disposable tips for each specimen.
- 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.
- 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.
- 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).
- 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

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 calibrators 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), calibrators (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 calibrators, controls and patient samples
2. The optical density of each calibrator 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 calibration 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 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

For the determination of the intraassay 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 interassay 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

Revision date : 2016-02-22



SPERM ANTIBODY ELISA

ES

KAPD1826
DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

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 (H₂SO₄) 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.

- | |
|----|
| UU |
|----|

Tiras de microplacas recubiertas con antígenos espermáticos
96 pocillos
- | | |
|-----|---|
| CAL | N |
|-----|---|

Estándares del ELISA anticuerpo Espermático
N=1 to 4
4 vials, 0.5 ml
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)
Listo para usar
- | | |
|----|-----|
| Ab | HRP |
|----|-----|

Enzima conjugado
1 vial, 8 ml
Listo para usar
- | | |
|-----|-----|
| DIL | BUF |
|-----|-----|

Tampón de Dilución
2 vials, 50 ml/vial
también usado como blanco / Estándar cero / 0 U/mL
- | | |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

Solución Sustrato
1 vial, 13 ml
Listo para usar
solución de TMB
- | | |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

Solución de Parada
1 vial, 13 ml
0.25 mol/L H₂SO₄
- | | | |
|------|------|------|
| WASH | SOLN | CONC |
|------|------|------|

Solución de lavado (10x)
1 vial, 50 ml
- | | |
|---------|---|
| CONTROL | N |
|---------|---|

 Control
N=1, 1 vial, 0.5 ml (tapa de rosca verde)
- Soporte** para tiras sencillas

6 MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de Microplacas con filtro de 450nm, opcionalmente con un filtro de referencia de ≥ 550 nm.
- Pipetas multicanal con puntas desechables: 5 μ L, 50 μ L y 500 μ L.
- Tubos para la dilución de las muestras.
- Agua destilada o desionizada.
- Papel Absorbente.
- Por favor, usar solamente pipetas e instrumentos calibrados.

7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este kit se ha diseñado solo para uso *in vitro*.
- 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 – 8 °C): hasta una semana
 - Temperatura de Congelador (-10 °C – -20 °C): hasta un año

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 gammopatías 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.

Revision date : 2016-02-22