

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of antibodies directed against spermatozoa antigens in serum



DE1020



96

1. INTENDED USE

The anti-spermatozoa 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 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 Anti-Spermatozoa Antibody ELISA can be applied in the clinical practice for the diagnosis immunologically caused infertility in men and in women.

4. PRINCIPLES OF THE ASSAY METHOD

The anti-spermatozoa 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 0.5 N acidic solution. 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

(sufficient for 96 determinations)

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

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

1. Microplate reader with 450 nm filter, optionally with a reference filter ≥ 550 nm.
2. Microliter pipettes with disposable tips: 5 μ l, 50 μ l and 500 μ l.
3. Tubes for the dilution of the samples
4. Distilled or deionised water
5. Absorbent paper.

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 – 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 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.

13. 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.

14. CALCULATION OF THE 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.

15. 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.

16. 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.

17. ASSAY PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Intraassay 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. Interassay 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.

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Anti-Spermatozoen-Antikörper-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 dient in der klinischen Praxis 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 0,5 N saurer Lösung in Gelb umschlägt. Die Extinktion wird mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Benutzung einer Referenzwellenlänge von ≥ 550 nm wird empfohlen, ist aber nicht zwingend.

5. BESTANDTEILE DES KITS

(ausreichend für 96 Bestimmungen)

1.	12 Mikrotiterstreifen à 8 Näpfe, beschichtet mit Sperma-Antigen	96 Näpfe
2.	Sperma-Antikörper ELISA Standardreihe – pro Fläschchen	0,5 ml
3.	Standard 1, (31 Einheiten/ml Serum – farbloser Schraubdeckel)	
4.	Standard 2, (62 Einheiten/ml Serum – weißer Schraubdeckel)	
5.	Standard 3, (125 Einheiten/ml Serum – gelber Schraubdeckel)	
6.	Standard 4, (250 Einheiten/ml Serum – blauer Schraubdeckel)	
7.	Kontrolle (grüner Schraubdeckel)	0,5 ml
8.	Verdünnungspuffer (wird auch als Blank / Nullstandard / 0 U/ml verwendet)	50 ml
9.	Waschpuffer (10-fach konzentriert)	50 ml
10.	Enzymkonjugat (gebrauchsfertig)	8 ml
11.	Substratlösung (TMB, gebrauchsfertig)	13 ml
12.	Stopplösung (0,5 N saure Lösung)	13 ml
13.	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 ≥ 550 nm.
2. Mikroliterpipetten mit auswechselbaren Spitzen: 5 μ l, 50 μ l, and 500 μ 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 (0,5 N saure Lösung), 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 – 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 – 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 – 8 °C) bis zu einer Woche
 - Haushaltsgefrierschranktemperatur (-10 °C – -20 °C): bis zu einem Jahr

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 – 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. LEISTUNGSDATEN DES ANTI-SPERMATOZOEN-ANTIKÖRPER-ELISA

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

Zur Bestimmung der intraseriellen 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 interseriellen 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.