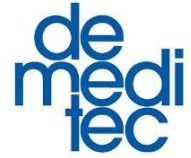


Product information

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



Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) seminal ELISA



DE1021



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	8
8	QUALITY CONTROL	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
10	LIMITATIONS OF USE	8
11	LEGAL ASPECTS	9
1	ZWECKBESTIMMUNG	10
2	TESTPRINZIP	10
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	11
4	BESTANDTEILE DES KITS	12
5	PROBENVORBEREITUNG	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	13
7	ERWARTETE WERTE	15
8	QUALITÄTSKONTROLLE	15
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	15
10	GRENZEN DES TESTS	15
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	16
1	DESTINAZIONE D'USO	17
2	PRINCIPIO DEL TEST	17
3	PRECAUZIONI	18
4	COMPONENTI DEL KIT	19
5	CAMPIONI	20
6	ATTUAZIONE DEL TEST	20
7	VALORI NORMALI	22
8	CONTROLLO QUALITÀ	22
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	22
10	LIMITAZIONE DEL TEST	22
11	ASPETTI LEGALI	23
1	FINALIDAD PREVISTA	24
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	24
3	PRECAUCIONES	25
4	COMPONENTES DEL KIT	26
5	MUESTRAS.....	27
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	27
7	VALORES ESPERADOS	29
8	CONTROL DE CALIDAD.....	29
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	29
10	LIMITACIONES DE USO.....	29
11	ASPECTOS LEGALES.....	30
12	REFERENCES / LITERATURE	31
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	32

1 INTENDED USE

The **DEMEDITEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative **in vitro diagnostic** measurement of antibodies directed against human spermatozoa in seminal plasma.

1.1 Summary and Explanation

Antibodies directed against spermatozoa antigens may cause infertility in women or men. The application of the Sperm 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 5-20 % of these cases, the presence of anti-spermatozoa antibodies in the male or the female patient is detectable [1,2,15].

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 (ASA) exert heterogeneous effects on the ability of spermatozoa to fertilize. The inhibiting effect of ASA on the motility of spermatozoa by binding to their surface and by agglutinating processes is well-known [3].

The penetration of the spermatozoa into the cervical mucus is impaired by the presence of ASA in the seminal plasma and/or in the cervical mucus [4]. ASA negatively influence the capacitation and the acrosome reaction of spermatozoa, and thereby impede the interaction of the spermatozoa with the oocyte [5,6]. The interaction of the spermatozoon with the oocyte and the subsequent binding to and penetration of the zona pellucida may be inhibited by ASA. The following fusion of the oocyte and a spermatozoon may also be impaired by the presence of ASA [7,8]. The rate of pregnancies in couples with ASA on the part of the man or the woman was shown to be 38% lower compared to the control groups [9]. Furthermore, an influence on the implantation and on the early embryological development could be confirmed. An association of ASA and miscarriages is discussed. The frequency of ASA in infertile couples amounts to 20% [10,11]. ASA may occur dissolved in the ejaculate or bound to the surface of spermatozoa. ASA may be found in men and in women [12]. In women, ASA 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 [13].

ASA have been shown to be associated with chronic prostatitis which has a negative effect on male reproductive function [14].

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDITEC Sperm Antibody ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**.

The microtiter wells are coated with a mix of spermatozoa proteins.

During incubation, anti-spermatozoa antibodies in the samples (standards, controls, patient specimen) bind to the coated surface of the wells. A washing step removes unbound sample components.

Added enzyme conjugate binds to the immobilized antigen-antibody-complexes. The conjugate contains anti-human immunoglobulin antibodies, labelled with horseradish peroxidase (HRP). After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is proportional to the concentration of the analyte in the sample. A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 REAGENTS

4.1 Materials provided

- SORB** **MT** **Microtiterwells**, 12 x 8 wells (break apart); Microtiter plate, coated with a mix of spermatozoa proteins.
- DIL** **Dilution Buffer / Zero Standard**, 1 x 50 mL, Sample Diluent *, ready to use; Concentration: 0 U/mL.
- CAL** **1 - 4** **Standard (Standard 1 - 4)**, 4 vials x 0.5 mL, Standards *, ready to use; Concentrations: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL.
- CONTROL** **Quality Control**, 1 vial x 0.5 mL, Controls *, ready to use; For control values and ranges please refer to Certificate of Analysis (CoA). Contain material of animal origin.
- ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 x 8 mL, Enzyme Conjugate *, ready to use; Anti-human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase; Colored red. Contains material of animal origin.
- SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 x 14 mL, Substrate Solution, ready to use; Contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Keep away from direct sun light.
- STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 x 14 mL, Stop Solution ready to use; Contains < 5 % H₂SO₄. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
- WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution**, 1 x 30 mL, Wash Solution (40X concentrated) ♦; See "Reagent Preparation".

1x Cover foil

1x Instructions for Use

1x Certificate of Analysis (CoA)

* Contain(s) < 0.0015 % CMIT/ MIT (3:1)

♦ Contain(s) 0.0108 % CMIT/ MIT (3:1)

Abbreviations:

CMIT: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one

MIT: 2-methylisothiazol-3(2H)-one

BND: 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Incubator for 37 °C
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 4 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

Stability after dilution:	at 20 °C to 26 °C	1 week
---------------------------	-------------------	--------

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DEMEDITEC must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed of according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Seminal plasma can be used in this assay.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Collect fresh ejaculate, centrifuge at room temperature and take the supernatant (seminal plasma).

5.2 Specimen Storage and Preparation

Seminal plasma should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens stored for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

Prior to assaying, dilute each sample (seminal plasma) **1:5** with Dilution Buffer.

Example:

Dilution 1:5: 100 µL sample + 400 µL Dilution Buffer (mix thoroughly)

Note: The Quality Control is ready to use and must not be diluted!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
 2. Dispense **50 µL** of each **Zero Standard, Standard, Quality Control** and **diluted sample with new disposable tips** into appropriate wells.
 3. Cover with foil and incubate for **60 minutes** at **37 °C**.
 4. Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted Wash Solution per well, if a plate washer is used.
- OR -
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted Wash Solution per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
- Important note:**
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **50 µL Enzyme Conjugate** into each well.
 6. Cover with foil and incubate for **60 minutes** at **37 °C**.
 7. Rinse the wells **5 times** with **400 µL** diluted Wash Solution per well, if a plate washer is used.
- OR -
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with **300 µL** diluted Wash Solution per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
 8. Add **50 µL of Substrate Solution** to each well.
 9. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
 10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well.
 11. Measure the optical density (OD) of the solution in each well at **450 nm (measurement wavelength) and at 620 nm or 630 nm (reference wavelength for recommended background subtraction)** with a microtiter plate reader.
- It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the Stop Solution.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit (4-Parameter Rodbard or 4-Parameter Marquardt are the preferred methods.). Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve.

The standards are already pre-diluted, therefore the 1:5 dilution of the samples must not be taken into account for the final calculation of sample concentrations.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Density (450 nm)
Zero Standard (0 U/mL)	0.12
Standard 1 (31 U/mL)	0.47
Standard 2 (62 U/mL)	0.82
Standard 3 (125 U/mL)	1.47
Standard 4 (250 U/mL)	2.54

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

Normal values	0 U/mL – 55 U/mL
Borderline	55 U/mL – 65 U/mL
Elevated values	> 65 U/mL

In case of values in the range near the cut-off (55 U/mL to 65 U/mL), we recommend a follow-up determination using a new sample taken within the next two weeks.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Detection Capability

Calculated according to CLSI guideline EP17-A2:2012.

Limit of Blank (LoB)	1.900 U/mL
Limit of Detection (LoD)	9.989 U/mL
Limit of Quantification (LoQ)	34.299 U/mL
Measuring range	9.989 – 250 U/mL

9.2 Repeatability

For the determination of the repeatability, 4 samples were measured in 12 replicates per run.

Mean CV: 2.8 % (range from 2.4 % – 3.8 %)

9.3 Reproducibility (between run)

For the determination of the inter-assay precision one strip each of 12 kits stemming from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (OD > 1.0) was applied 72 times per testing procedure.

Mean CV: 7.15 % (range from 6.04 % – 8.21 %)

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DEMEDIATEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Spermatozoen in Seminalplasma eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

1.1 Zusammenfassung und Erklärung

Antikörper, die gegen Spermatozoen-Antigene gerichtet sind, können Unfruchtbarkeit bei Frauen oder Männern verursachen. Die Anwendung des Sperm Antibody 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 5% bis 20 % dieser Fälle werden Anti-Spermatozoen-Antikörper bei männlichen oder weiblichen Patienten nachgewiesen [1,2,15]. 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 (ASA) 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 [3]. Das Durchdringen des Zervikalmucus durch die Spermatozoen wird durch die Anwesenheit von ASA im Seminalplasma und/oder im Zervikalmucus beeinträchtigt [4]. ASA beeinflussen die Fähigkeit zur Kapazitation und die Akrosomenreaktion der Spermatozoen und behindern dadurch die Interaktion der Spermatozoen mit der Eizelle [5,6]. Die Interaktion des Spermatozoons mit der Eizelle sowie die spätere Bindung an diese und das Durchdringen der Zona pellucida kann durch ASA verhindert werden. Auch die darauf folgende Verschmelzung des Spermatozoons mit der Eizelle kann durch die Anwesenheit von ASA beeinträchtigt werden [7,8]. Es wurde gezeigt, dass die Schwangerschaftsquote bei Paaren mit ASA auf Seiten des Mannes oder der Frau im Vergleich zu den Kontrollgruppen um 38 % vermindert ist [9]. 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 ASA und Fehlgeburten wird diskutiert. Die Häufigkeit von ASA bei infertilen Paaren liegt bei 20 % [10,11]. Diese Antikörper können ungebunden im Ejakulat auftreten oder an die Oberfläche von Spermatozoen gebunden sein. Anti-Spermatozoen-Antikörper können sowohl bei Männern als auch bei Frauen gefunden werden [12]. Bei Frauen werden ASA 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 [13]. Es wurde gezeigt, dass ASA mit chronischer Prostatitis assoziiert sind, was einen negativen Einfluss auf die männliche Fortpflanzungsfunktion hat [14].

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert. Die Wells der Mikrotiterplatte sind mit einer Mischung humaner Spermatozoen-Antigene beschichtet. Während der Inkubation binden sich Anti-Spermatozoen-Antikörper in der Probe (Standards, Kontrollen, Patientenproben) an die beschichtete Oberfläche der Vertiefungen. In einem Waschschrift werden ungebundene Probenbestandteile entfernt.

Zugegebenes Enzymkonjugat bindet an die immobilisierten Antigen-Antikörper-Komplexe.

Das Konjugat enthält anti-humane Immunoglobulin-Antikörper, die mit Meerrettichperoxidase markiert sind. Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe. Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
2. Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
3. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
4. Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
5. Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
6. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
7. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
8. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
9. Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
10. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
11. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
12. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
13. Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
14. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DEMEDITEC Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); mit einer Mischung aus Spermienproteinen beschichtet.
2. **DIL** **Dilution Buffer / Zero Standard** (Probenverdünnungsmedium* / Nullstandard), 1 Fläschchen, 50 mL, gebrauchsfertig.
3. **CAL** **1 – 4** **Standard (Standard 1 - 4)**, Standards*; 4 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL.
4. **CONTROL** **Quality Control** (Kontrolle*), 1 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig; Die Kontrollwerte und -bereiche sind dem Etikett des Fläschchens oder dem Analysezertifikat zu entnehmen (CoA). Enthält Material tierischen Ursprungs.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat*), 1 Fläschchen, 8 mL, gebrauchsfertig; Anti-humanes Poly-Ig konjugiert mit Meerrettichperoxidase; rot gefärbt; enthält Material tierischen Ursprungs.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Von Sonnenlicht fernhalten.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält < 5 % H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und -verätzungen verursachen.
8. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Waschlösung♦), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X**-Konzentrat; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

1x Deckfolie

1x Gebrauchsanweisung (IFU)

1x Analysenzertifikat (CoA)

* Enthält < 0,0015 % CMIT/MIT (3:1)

♦ Enthält 0,0108 % CMIT/MIT (3:1)

Abkürzungen:

CMIT: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on

MIT: 2-methylisothiazol-3(2H)-on

BND: 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxan

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Inkubator für 37 °C
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 4 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.

Wash Solution

Fügen Sie der 40-fach konzentrierten Waschlösung (Wash Solution) destilliertes Wasser hinzu. 30 mL der konzentrierten Waschlösung mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1200 mL verdünnen.

Stabilität nach Verdünnung:	bei 20 °C bis 26 °C	1 Woche
-----------------------------	---------------------	---------

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Seminalplasma kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Zur Gewinnung von Seminalplasma zentrifugieren Sie frisches Ejakulat und pipettieren anschließend das überstehende Seminalplasma vorsichtig ab.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Vor Einsatz im Test müssen die Proben (Seminalplasma) **1:5** mit Dilution Buffer verdünnt werden.

Beispiel:

Verdünnung 1:5: 100 µL Probe + 400 µL Dilution Buffer (gründlich mischen)

Beachten: Die Kontrolle (Quality Control) ist gebrauchsfertig und muss nicht verdünnt werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG**6.1 Allgemeine Hinweise**

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL Zero Standard, Standard, Quality Control** und **verdünnte Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. Mit Folie abdecken und **60 Minuten** bei **37 °C** inkubieren.
4. Wells **3-mal** mit **400 µL** verdünnter Wash Solution waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird.
- ODER -
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter Wash Solution waschen bei manueller Durchführung.
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
5. **50 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
6. Mit Folie abdecken und **60 Minuten** bei **37 °C** inkubieren.
7. Wells **5-mal** mit **400 µL** verdünnter Wash Solution waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird.
- ODER -
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **5-mal** mit **300 µL** verdünnter Wash Solution waschen bei manueller Durchführung.
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **50 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
9. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
11. Messen Sie die optische Dichte (OD) der Lösung in jeder Vertiefung bei 450 nm (Messwellenlänge) und bei 620 nm oder 630 nm (Referenzwellenlänge für die empfohlene Hintergrundsubtraktion) mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät.
Es wird empfohlen, die Vertiefungen innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Stopplösung zu messen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung bestimmt. (4-Parameter-Rodbard oder 4-Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Die Standards sind bereits vorverdünnt, daher darf die 1:5 Verdünnung der Proben bei der endgültigen Berechnung der Probenkonzentrationen nicht berücksichtigt werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Zero Standard (0 U/mL)	0,12
Standard 1 (31 U/mL)	0,47
Standard 2 (62 U/mL)	0,82
Standard 3 (125 U/mL)	1,47
Standard 4 (250 U/mL)	2,54

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Normalbereich:	0 U/mL – 55 U/mL
Grenzbereich:	55 U/mL – 65 U/mL
Erhöhte Werte:	> 65 U/mL

Bei Werten im Grenzbereich (55 U/mL bis 65 U/mL) empfehlen wir eine Nachbestimmung mit einer neuen Probe, die innerhalb der nächsten zwei Wochen entnommen wird.

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Detektionsfähigkeit

„Limit of Blank“ (LoB)	1,900 U/mL
Nachweisgrenze (LoD)	9,989 U/mL
Quantifizierungsgrenze (LoQ)	34,299 U/mL
Messbereich	9.989 – 250 U/mL

9.2 Wiederholbarkeit

Für die Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden 4 Patientenproben in 12 Wiederholungen pro Lauf gemessen.

Mittlerer VK: 2,8 % (Bereich von 2,4 % - 3,8 %)

9.3 Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurde jeweils ein Streifen von 12 Kits, die von 6 verschiedenen, an unterschiedlichen Tagen produzierten Chargen stammten, verwendet. Eine Patientenprobe (OD > 1,0) wurde 72-mal pro Testdurchlauf verwendet.

Mittlerer VK: 7,15 % (Bereich von 6,04 % – 8,21 %)

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-spermatozoi in plasma seminale umano. **Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

1.1 Riassunto e spiegazione

Gli anticorpi specifici per antigeni degli spermatozoi possono causare infertilità in donne e uomini. L'utilizzo del test Sperm Antibody ELISA è raccomandato per la diagnosi di disordini alla fertilità di origine immunologica.

L'incapacità a procreare è un problema crescente che riguarda fino al 20 % di coppie in età riproduttiva in modo temporaneo o a lungo termine. Nel 5 % - 20 % di questi casi si è evidenziata la presenza di anticorpi anti-spermatozoi nei pazienti di sesso maschile o femminile [1,2,15].

La definizione d'infertilità secondo il WHO (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical-Mucus Interaction, 1999) è l'assenza di concepimento per un periodo di 12 mesi di rapporti non protetti. La causa più importante di un disordine della fertilità di origine immunologica è la formazione di anticorpi contro antigeni degli spermatozoi.

Gli anticorpi anti-spermatozoi (ASA) esercitano una serie eterogenea di effetti sulla capacità degli spermatozoi di fecondare. L'effetto inibitore di ASA sulla mobilità degli spermatozoi a causa del legame sulla loro superficie e i processi di agglutinazione è ben noto [3].

La penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale è ostacolata dalla presenza di anticorpi anti-spermatozoi nel liquido seminale e/o nel muco cervicale [4]. ASA influenzano negativamente la capacitazione e la reazione acrosomiale degli spermatozoi e quindi impedisce la interazione degli spermatozoi con l'ovocita [5,6]. L'interazione dello spermatozoo con l'ovocita e il successivo legame e penetrazione della zona pellucida possono essere inibiti da ASA. Anche la fusione derivante dell'ovocita e dello spermatozoo può essere pregiudicata dalla presenza di ASA [7,8].

Secondo Crosignani et al. [9] la percentuale di gravidanze in coppie con anticorpi anti-spermatozoi nell'uomo o nella donna è del 38 % inferiore a quella di gruppi di controllo. Inoltre è stata confermata un effetto sull'impianto dell'ovulo e sul primo sviluppo embrionale. E' attualmente in discussione una relazione tra anticorpi anti-spermatozoi e aborto. La presenza di anticorpi anti-spermatozoi in coppie infertili ammonta al 20 % [10,11]. Gli anticorpi anti-spermatozoi possono essere presenti in soluzione nell'eiaculato o legati alla superficie degli spermatozoi. ASA possono ritrovarsi sia nell'uomo che nella donna [12]. Nella donna ASA possono trovarsi nel muco cervicale, nel liquido del dotto ovarico e nel liquido follicolare. Gli uomini con presenza di anticorpi anti-spermatozoi in oltre il 50 % dei loro spermatozoi presentano un quoziente di fertilità notevolmente ridotto [13]. È stato dimostrato che gli anticorpi anti-spermatozoi (ASA) sono associati alla prostatite cronica che ha un effetto negativo sulla funzione riproduttiva maschile [14].

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DEMEDIATEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul **principio sandwich**.

I micropozzetti sono ricoperti con una miscela di proteine di spermatozoi. Durante l'incubazione, gli anticorpi anti-spermatozoi umani nel campione del paziente si legano alla superficie rivestita dei pozzetti. Una fase di lavaggio rimuove i componenti del campione non legati. Il coniugato enzimatico aggiunto si lega ai complessi antigene-anticorpo immobilizzati. Il coniugato contiene anticorpi anti-immunoglobulina umana marcati con perossidasi di rafano (HRP). Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (OD) del prodotto giallo risultante. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Una curva standard viene costruita tracciando i valori di OD rispetto alle concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 PRECAUZIONI

1. Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
2. Si prega di usare la versione valida dell'insero del pacco a disposizione con il kit.
3. Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
4. Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
5. Il contatto con la Stop Solution dovrebbe essere evitato perché contiene 0,5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
6. Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
7. Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
8. Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
9. L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
10. Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
11. Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
12. Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
13. I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
14. I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Piastra per microtitolazione), 12 x 8 pozzetti (separabili); Rivestito con una miscela di proteine degli spermatozoi; pronto all'uso.
2. **DIL** **Dilution Buffer / Zero Standard** (Diluente per campioni* / Standard zero), 1 flacone, 50 mL, pronto all'uso.
3. **CAL** **1 - 4** **Standard (Standard 1 - 4)**, 4 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso;
Concentrazione: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL.
4. **CONTROL** **Quality Control** (Controllo*), 1 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso;
Per i valori di controllo e gli intervalli fare riferimento all'etichetta della fiala o al Certificato di analisi (CoA); Contiene materiale di origine animale.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Coniugato enzimatico*), 1 flacone, 8 mL, pronto all'uso;
Poli-Ig umane coniugate con perossidasi di rafano. Colorato di rosso. Contiene materiale di origine animale.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Tenere al riparo dalla luce del sole.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Soluzione di arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
Contiene 0,5 M H₂SO₄. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio[♦]), 1 flacone, 30 mL (Concentrato 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

1x Foglio di copertura

1x Istruzioni per l'uso (IFU)

1x Certificato di analisi (CoA)

* Contiene < 0,0015 % CMIT/MIT (3:1)

♦ Contiene 0,0108 % CMIT/MIT (3:1)

Abbreviazioni:

CMIT: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one

MIT: 2-metil-2H-isotiazol-3-one

BND: 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm)
- Incubatrice, 37 °C
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 4 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Wash Solution

Aggiungere acqua distillata alla soluzione di lavaggio con concentrazione di 40X.

Diluire 30 mL soluzione di lavaggio concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino a un volume finale di 1200 mL.

Stabilità dopo la diluizione:	da 20 °C a 26 °C	1 settimana
-------------------------------	------------------	-------------

4.5 Smaltimento del kit

La discarica del kit e di tutti i materiali/reagenti usati devono avvenire secondo i regolamenti nazionali. Informazioni aggiuntive per questo prodotto si trovano nella scheda di dati di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

In caso di alcun danno al test kit o ai suoi componenti, DEMEDITEC deve essere informato per iscritto, al Massimo una settimana dopo la ricezione del kit. Componenti singoli danneggiati non devono essere usati per un saggio. Questi devono essere conservati fino ad aver trovato una soluzione finale. Dopo, questi componenti devono essere scaricati secondo i regolamenti ufficiali.

5 CAMPIONI

Il plasma seminale può essere utilizzato per questo test.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Raccogliere eiaculato fresco, centrifugare a temperatura ambiente e prendere il surnatante (plasma seminale).

5.2 Magazzinaggio dei campioni

Il plasma seminale dovrebbe essere immagazzinato ben chiuso fino a 7 giorni a 2 °C a 8 °C.

Campioni immagazzinati per un periodo più lungo (fino a 12 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Prima del dosaggio, diluire ogni campione (plasma seminale) **1:5** con il tampone di diluizione.

Esempio:

diluizione 1:5: 100 µL campione + 400 µL Dilution Buffer (miscelare accuratamente)

Nota: Il controllo (Quality Control) è pronto all'uso e non deve essere diluito!

6 ATTUAZIONE DEL TEST**6.1 Indicazioni generali**

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
 2. Pipettare **50 µL** ciascuno di **Zero Standard, Standard, Quality Control** e **campione diluiti** nei pozzetti appropriati, cambiando ogni volta la punta monouso.
 3. Coprire con un foglio e incubare per **60 minuti** a **37 °C**.
 4. Lavare i pozzetti **3 volte** con **400 µL** Wash Solution diluita in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio.
- OPPURE -
Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con **300 µL** Wash Solution diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
- Importante:**
La sensibilità e la precisione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
5. Pipettare **50 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
 6. Coprire con un foglio e incubare per **60 minuti** a **37 °C**.
 7. Lavare i pozzetti **5 volte** con **400 µL** Wash Solution diluita in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio.
- OPPURE -
Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con **300 µL** Wash Solution diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
 8. Aggiungere **50 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
 9. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
 10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
 11. Misurare la densità ottica (DO) della soluzione in tutti i pozzetti a 450 nm (lunghezza d'onda di misurazione) e a 620 nm o 630 nm (lunghezza d'onda di riferimento per la sottrazione dello sfondo raccomandata) utilizzando un lettore per piastre per microtitolazione.
Si consiglia di effettuare la lettura dei pozzetti entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

6.3 Determinazione dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle DO per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4-parametri. (I metodi preferiti sono 4-Parameter Rodbard oppure 4-Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard.

Gli standard sono già pre-diluiti, pertanto la diluizione 1:5 dei campioni non deve essere presa in considerazione per il calcolo finale delle concentrazioni dei campioni.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Zero Standard (0 U/mL)	0,12
Standard 1 (31 U/mL)	0,47
Standard 2 (62 U/mL)	0,82
Standard 3 (125 U/mL)	1,47
Standard 4 (250 U/mL)	2,54

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

Valori normali	0 U/mL – 55 U/mL
Intervallo limite	55 U/mL – 65 U/mL
Valori elevati	> 65 U/mL

Se il valore è nell'intervallo limite (da 55 U/mL a 65 U/mL), si consiglia di ripetere la determinazione con un nuovo campione raccolto entro le due settimane successive.

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio.

Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Capacità di rilevamento

Calcolo effettuato in base alle linee guida CLSI EP17-A2:2012.

Limite del bianco (LoB)	1,900 U/mL
Limite di rilevabilità (LoD)	9,989 U/mL
Limite di quantificazione (LoQ)	34,299 U/mL
Intervallo di misurazione	9.989 – 250 U/mL

9.2 Ripetibilità

Per determinare la ripetibilità, sono stati misurati 4 campioni di pazienti in 12 ripetizioni per corsa.

CV medio: 2,8 % (intervallo da 2,4 % a 3,8 %)

9.3 Riproducibilità (precisione inter-serie)

Per la determinazione della precisione inter-saggio è stata utilizzata una striscia per ognuno di 12 kit provenienti da 6 lotti diversi (prodotti in giorni differenti). Un campione di paziente (densità ottica circa 1,0) è stato dosato 72 volte per ogni serie analitica.

CV medio: 7,15 % (intervallo 6,04 % – 8,21 %)

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP). Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

1 FINALIDAD PREVISTA

El Kit de inmunoensayo enzimático **DEMEDIATEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa de anticuerpos dirigidos contra espermatozoides humanos en plasma seminal. Este ensayo está diseñado solo para **diagnóstico in vitro**.

1.1 Resumen y explicación

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos de espermatozoides pueden causar infertilidad en mujeres y hombres. Se recomienda el uso del Sperm Antibody ELISA 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 5 % - 20 % de estos casos se detecta la presencia de anticuerpos anti-espermatozoide en el paciente masculino o femenino [1,2,15]. 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 (AAE) 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 [3]. La penetración de los espermatozoides en el mucus cervical se debilita en presencia de AAE en el plasma seminal y/o en el mucus cervical [4]. AAE 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 [5,6]. La interacción del espermatozoide con el oocito y la subsiguiente unión y la penetración de la zona pelúcida puede ser inhibida por AAE. La subsiguiente fusión del oocito y el espermatozoide puede ser impedida también por la presencia de AAE [7,8]. De acuerdo con Crosignani et al. [9] 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 AAE en parejas infértiles asciende al 20 % [10,11].

AAE pueden aparecer disueltos en el eyaculado o unidos a la superficie de los espermatozoides. Pueden encontrarse en hombres y en mujeres [12]. En mujeres, AAE 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 AAE muestran una llamativa reducción de la razón de fertilidad [13].

Se ha demostrado que los anticuerpos antiespermatozoides (AAE) están asociados con la prostatitis crónica, que tiene un efecto negativo en la función reproductiva masculina [14].

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DEMEDIATEC Sperm Antibody (seminal plasma) ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el **principio del sándwich**.

Los pocillos de las placas están recubiertos con una mezcla de proteínas de espermatozoides. Durante la incubación, los anticuerpos anti-espermatozoides de las muestras (estándares, controles, muestra del paciente) se unen a la superficie recubierta de los pocillos. Un paso de lavado elimina los componentes de la muestra no ligados. El conjugado enzimático añadido se liga a los complejos antígeno-anticuerpo inmovilizados. El conjugado enzimático contiene anticuerpos de inmunoglobulina antihumana, marcados con peroxidasa de rábano (HRP). Después de un paso de lavado para eliminar todas las sustancias no ligadas, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de la solución de parada, y se mide la densidad óptica (OD) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra. Se construye una curva estándar trazando los valores de DO frente a las concentraciones de los estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva estándar.

3 PRECAUCIONES

1. Este kit es solamente para diagnóstico in vitro.
2. Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
3. Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
4. Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
5. Evitar contacto con Stop Solution que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
6. Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
7. No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
8. Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
9. El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
10. No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
11. Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
12. No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
13. Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
14. Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Placa de microtítulo), 12 x 8 pocillos (por separado); Recubierto con una mezcla de proteínas de espermatozoides. Listo para usar.
2. **DIL** **Dilution Buffer / Zero Standard** (Diluyente de muestras* / Estándar cero), 1 vial, 50 mL, listo para usar.
3. **CAL** **1 - 4** **Standard (Standard 1 - 4)**, (Estándares*), 4 viales, 0,5 mL cada, listos para usar; Concentraciones: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL.
4. **CONTROL** **Quality Control** (Control*), 1 vial, 0,5 mL cada, listos para usar; Para valores de control e intervalos, consulte la etiqueta del vial o el Certificado de Análisis (CoA). Contiene material de origen animal.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático*), 1 vial, 8 mL, listo para usar; Poli Ig antihumana conjugada con peroxidasa de rábano picante. Color rojo. Contiene material de origen animal.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Mantener lejos de la luz solar.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Contiene < 5 % H₂SO₄. Evite el contacto con la solución de parada. Puede provocar irritación cutánea o quemaduras.
8. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (Concentrado 40X[♦]); Ver "Preparación de los Reactivos".

1x Folio de cubierta

1x Instrucciones de uso (IFU)

1x Certificado de análisis (CoA)

* Contiene < 0.0015 % CMIT/ MIT (3:1)

♦ Contiene 0.0108 % CMIT/ MIT (3:1)

Abreviaturas:

CMIT: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona

MIT: 2-metilisotiazol-3(2H)-ona

BND: 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm)
- Incubadora, 37 °C
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C a 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C a 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C a 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 4 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de usarse.

Wash Solution

Añada agua destilada a la solución de lavado concentrada a 40X (Wash Solution). Diluya 30 mL de solución de lavado concentrada con 1170 mL de agua destilada hasta llegar a un volumen final de 1200 mL.

Estabilidad tras la dilución:	entre 20 °C y 26 °C	1 semana
-------------------------------	---------------------	----------

4.5 Eliminación del Kit

El desecho del kit y de los materiales/reactivos usados ha de realizarse conforme a la regulación nacional en vigor. Información adicional sobre este producto se ofrece en las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet), capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de cualquier daño severo en el kit o en sus componentes, DEMEDITEC ha de ser informada por escrito una semana después de recibir el kit como fecha límite. Componentes individuales que hayan sufrido daños importantes no deberían usarse para realizar el test. Han de ser almacenados hasta que se haya encontrado una solución final al problema. Después de encontrarse una solución, pueden ser desechados en concordancia con las reglas oficiales en vigor.

5 MUESTRAS

El plasma seminal puede ser usado en este ensayo.
Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Recoger el eyaculado fresco, centrifugarlo a temperatura ambiente y tomar el sobrenadante (plasma seminal).

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras (plasma seminal) deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 12 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Antes de ensayar, diluya la muestra (plasma seminal) **1:5** con tampón de dilución (Dilution Buffer).

Ejemplo:

Dilución 1:5: 100 µL muestra + 400 µL Dilution Buffer (mezclar totalmente)

Nota: El control (Quality Control) está listo para usar do y no debe ser diluido!

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO**6.1 Consideraciones generales**

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La densidad óptica es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **50 µL** de cada **Zero Standard, Standard, Quality Control y muestra diluida con puntas nuevas** en los pocillos adecuados.
3. Cubrir con un folio e incubar durante **60 minutos a 37 °C**.
4. Lavar los pocillos **3 veces** con **400 µL** Wash Solution diluida por pocillo, si se utiliza un lavador de placas.
- O -
Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con **300 µL** Wash Solution diluida por pocillo para el lavado manual.
Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
- Nota importante:** La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
5. Dispensar **50 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo
6. Cubrir con un folio e incubar durante **60 minutos a 37 °C**
7. Lavar los pocillos **5 veces** con **400 µL** Wash Solution diluida por pocillo, si se utiliza un lavador de placas.
- O -
Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **5 veces** con **300 µL** Wash Solution diluida por pocillo para el lavado manual.
Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
8. Adicionar **50 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
9. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
10. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
11. Mida la densidad óptica (DO) de la solución a 450 nm (longitud de onda de medición) y entre 620 nm o 630 nm (longitud de onda de referencia para la sustracción de fondo recomendada) con un lector de placas de microtítulo. Se recomienda realizar la lectura de los pocillos en los 10 minutos siguientes a la incorporación de la solución de parada.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la densidad óptica media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de la DO media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4-Parámetros. (4-Parámetros Rodbard o 4-Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares.

Los estándares ya están prediluidos, por lo que no se ha tenido en cuenta la dilución de 1:5 de las muestras para el cálculo final de las concentraciones de las muestras.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Densidad óptica (450 nm)
Zero Standard (0 U/mL)	0,12
Standard 1 (31 U/mL)	0,47
Standard 2 (62 U/mL)	0,82
Standard 3 (125 U/mL)	1,47
Standard 4 (250 U/mL)	2,54

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

Valores normales	0 U/mL – 55 U/mL
Límite	55 U/mL – 65 U/mL
Valores elevados	> 65 U/mL mL

Si el valor se encuentra en el rango límite (55 U/mL a 65 U/mL), recomendamos repetir la determinación con una nueva muestra tomada en las dos semanas siguientes.

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Capacidad de detección

Calculada siguiendo la directriz EP17-A2:2012 de CLSI.

Límite de blanco (LoB)	1,900 U/mL
Límite de detección (LoD)	9,989 U/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	34,299 U/mL
Intervalo de medición	9,989 – 250 U/mL

9.2 Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad, se midieron 4 muestras en 12 réplicas por serie.

CV medio: 2,8 % (intervalo de 2,4 % a 3,8 %).

9.3 Reproducibilidad (Precisión entre series)

Para la determinación de la precisión interensayo se utilizó una tira de cada uno de los 12 kits procedentes de 6 lotes diferentes (producidos en días distintos). Se aplicó una muestra de paciente (DO > 1,0) 72 veces por procedimiento de prueba.

CV medio: 7,15 % (intervalo de 6,04 % a 8,21 %).

10 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo. Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Lahteenmaki A et al. Hum Reprod (1995) 10, 2824-28
2. Nagy ZP et al. Hum Reprod (1995) 10, 1775-80.
3. Zouari R et al. Fertil Steril (1993) 59, 606-12
4. Eggert-Kruse W et al. Hum Reprod (1993) 8, 1025-31
5. Francavilla F et al. Front Biosci (1999) 4, 9-25
6. Bohring C et al. Hum Reprod (2001) 7, 113-8
7. Mazumdar S et al. Fertil Steril (1998) 70, 799-810
8. Kutteh WH. Hum Reprod (1999) 14, 2426-9
9. Vegetti Wet al. Hum Reprod (1998) 13, 1796-800
10. Lahteenmaki A et al. Hum Reprod (1995) 10, 2824-28
11. Nagy ZP et al. Hum Reprod (1995) 10, 1775-80
12. Clarke GN et al. Am J Reprod Immunol Microbiol (1985) 7, 143-7
13. Abshagen K et al. Fertil Steril (1998) 70, 355-6
14. Jiang Y et al. J Reprod Immunol (2016) 118:85-91
15. Lu SM et al. Asian J Androl (2019) 21(5):473-477
16. Clarke GN. Fertility and Sterility. (2009) 91(2) :639-643
17. Barbonetti A et al. Human Reproduction (2019) 34(5) : 834–841
18. Gatimel N et al. RBMO (2018) 00(0): 1-7.
19. Silva CA et al. Clinic Rev Allerg Immunol (2012) 42:256-263

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta