



SPERM-ANTIBODY- ELISA

KAPD1826



History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :																								
200224/1	220519																								
	<p>1 NAME AND INTENDED USE: More definitions for intended use and use not intended.</p>																								
	<p>7. Reagent Preparation: Correction for stability of diluted wash solution to 1 week (old: 2 weeks).</p>																								
	<p>9. Specimen Collection and Preparation: Sample stability at 2 °C to 8 °C changed to 2 months (instead of 12 months);</p>																								
<p>10.3.1 Example of Typical Standard Curve:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Standard</th> <th style="width: 50%;">Optical Density (450 nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Zero Standard (0 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.03</td> </tr> <tr> <td>Standard 1 (31 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.42</td> </tr> <tr> <td>Standard 2 (62 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.74</td> </tr> <tr> <td>Standard 3 (125 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">1.36</td> </tr> <tr> <td>Standard 4 (250 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">2.47</td> </tr> </tbody> </table>	Standard	Optical Density (450 nm)	Zero Standard (0 U/mL)	0.03	Standard 1 (31 U/mL)	0.42	Standard 2 (62 U/mL)	0.74	Standard 3 (125 U/mL)	1.36	Standard 4 (250 U/mL)	2.47	<p>10.2 Test Procedure: <u>Incubation time</u> for Enzyme Conjugate reduced to 30 minutes (old: 60 minutes). <u>Pipetting volume</u> for Stop Solution increased to 100 µL (old: 50 µL);</p> <p>10.3.1 Example of Typical Standard Curve:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Standard</th> <th style="width: 50%;">Optical Density (450 nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Zero Standard (0 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.147</td> </tr> <tr> <td>Standard 1 (31 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.515</td> </tr> <tr> <td>Standard 2 (62 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.857</td> </tr> <tr> <td>Standard 3 (125 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">1.423</td> </tr> <tr> <td>Standard 4 (250 U/mL)</td> <td style="text-align: center;">2.127</td> </tr> </tbody> </table>	Standard	Optical Density (450 nm)	Zero Standard (0 U/mL)	0.147	Standard 1 (31 U/mL)	0.515	Standard 2 (62 U/mL)	0.857	Standard 3 (125 U/mL)	1.423	Standard 4 (250 U/mL)	2.127
Standard	Optical Density (450 nm)																								
Zero Standard (0 U/mL)	0.03																								
Standard 1 (31 U/mL)	0.42																								
Standard 2 (62 U/mL)	0.74																								
Standard 3 (125 U/mL)	1.36																								
Standard 4 (250 U/mL)	2.47																								
Standard	Optical Density (450 nm)																								
Zero Standard (0 U/mL)	0.147																								
Standard 1 (31 U/mL)	0.515																								
Standard 2 (62 U/mL)	0.857																								
Standard 3 (125 U/mL)	1.423																								
Standard 4 (250 U/mL)	2.127																								

<p>11. Limitations of the Assay:</p> <p>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.</p> <p>Interfering Substances 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.</p>	<p>11. Limitations of the assay: Updated</p> <p>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.</p> <p>Interfering Substances Hemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results. 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.</p> <p>High-Dose Hook Effect "High-Dose Hook Effect" is not detected up to 5000 U/mL of ASA.</p>
<p>13. Performance Characteristics:</p> <p>1. Intra assay variation coefficient: 6.88% (5.90 – 7.81 %) For the determination of the intraassay variation coefficient 6 kits from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (optical density about 1.0) was applied 96 times per testing procedure.</p> <p>2. Inter assay variation coefficient: 6.45% (4.84 – 7.52 %) For the determination of the interassay variation coefficient one strip each of 12 kits stemming from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (optical density about 1.0) was applied 72 times per testing procedure</p>	<p>13. Performance Characteristics:</p> <p>Updated and additional data for the following criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sensitivity - Reproducibility - Recovery - Linearity



SPERM ANTIBODY ELISA

en

KAPD1826

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

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

1 NAME AND INTENDED USE

The **DIAsource Sperm Antibody ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of antibodies directed against human spermatozoa in serum.

The device is **intended** to be used as an aid for the diagnosis of immunologically caused disorders of fertility;

The device is **not intended** to be used for the detection of poly- and monoclonal gammopathies.

2 CLINICAL RELEVANCE

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].

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY METHOD

The DIAsource 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.

4 REAGENTS PROVIDED

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

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

 N=1 to 4
4 vials, 0.5 ml, ready to use
Calibrator 1 (31 U/ml)
Calibrator 2 (62 U/ml)
Calibrator 3 (125 U/ml)
Calibrator 4 (250 U/ml)
- | | |
|----|-----|
| Ab | HRP |
|----|-----|

 Enzyme Conjugate
1 vial, 8 ml
Anti-human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase
ready to use
- | | |
|-----|-----|
| DIL | BUF |
|-----|-----|

 1 vial, 50 ml/vial, ready to use
Also used as blank / zero calibrator 0 U/ml
- | | |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

 1 vial, 14 ml
Ready to use
Solution of TMB
- | | |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

 1 vial, 14 ml, ready to use
Contains 0.5M H₂SO₄
- | | | |
|------|------|------|
| WASH | SOLN | CONC |
|------|------|------|

 1 vial, 30 ml (40X concentrated)
- | | |
|---------|---|
| CONTROL | N |
|---------|---|

 N=1, 1 vial, 0.5 ml, ready to use
- Holder for single strips 1 x

5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT INCLUDED

- 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

6 WARNING AND PRECAUTIONS

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions for use completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to interchange 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.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- Do not reuse microtiter wells.
- Reagents of other manufacturers must not be used together with the reagents of this test kit.
- All reagents in this kit are clear liquids, substrate solution is clear and colorless. Changes in its appearance may affect the performance of the test. In that case, contact DIAsource ImmunoAssays.
Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- 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.
- All indicated volumes must be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- 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 original vials as reagent contamination may occur.

6.1 GENERAL PRECAUTIONS

- Follow good laboratory practice and safety guidelines.

2. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
3. Do not smoke, eat, drink, or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
4. Wear lab coats and disposable latex gloves when handling samples and reagents and where necessary safety glasses.

6.2 Biohazard information

1. 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. However, no known test method can offer total assurance that no infectious agent is present.
2. The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
3. Bovine components originate from countries where BSE (Bovine spongiform encephalopathy) has not been reported.
4. All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
5. Handling must be done in accordance with the procedures defined by appropriate national biohazard and safety guideline or regulation. Waste must be discarded according to local rules and regulations.

7 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
---------------------------	-------------------	--------

8 STORAGE INSTRUCTIONS AND SHELF LIFE INFORMATION

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 8 weeks if stored as described above.

9 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The following sample material can be used in this test:

Human serum

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

In general, it should be avoided to use hemolytic, icteric, or lipemic samples. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Specimen Storage

Samples must be stored tightly capped prior to performing the assay;

Stability	at 2 °C to 8 °C	4 days
	at -20 °C (in aliquots)	up to 2 months

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

Specimen Dilution

Prior to assaying, dilute each patient specimen **1:100** with *Dilution Buffer*.

Example:

Dilution 1:100: 5 µL sample + 495 µL *Dilution Buffer* (mix thoroughly)

Stability of diluted samples	at 2 °C to 8 °C	4 days
	at -20 °C (in aliquots)	7 days

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

10 ASSAY PROCEDURE

10.1 General Remarks

- All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (20 °C to 26 °C) before use.
- All reagents must be mixed without foaming.
- Do not interchange caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control, or sample in order to avoid carry-over.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results.

- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Once the test has been started, all steps must be completed without interruption and in the same sequence for each step.
- The enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Respect the incubations times and temperatures as given in chapter "Test Procedure".
- 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.
- During the incubation at 37 °C cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.
- **Important note to wash procedure:** Washing is critical. Improperly washed wells will give erroneous results. The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
- **Test performance using fully automated analysis devices:** Automated test performance using fully automated, open-system analysis devices is possible. However, the combination must be validated by the user.

10.2 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** each of **Zero Standard, Standard, Quality Control** and **diluted samples** 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 **30 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. Determine the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading)** and at **620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

10.3 Calculation of Results

1. The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.
The standards are already pre-diluted, therefore the 1:100 dilution of the samples must not be taken into account for the final calculation of sample concentrations.
2. For duplicate determinations, the mean of the two optical density (OD) values for each standard, control, and patient sample must be taken. If the two values deviate substantially from one another, DIAsource recommends retesting the samples.
3. Samples with concentrations exceeding the highest standard can be further diluted with Dilution Buffer and re-assayed as described in "Test Procedure", or must be reported as > 250 U/mL. For the calculation of the concentrations, this dilution factor must be considered.
4. Automated method:
The results in the instructions for use have been calculated automatically using a four-parameter logistic (4PL) curve fit. (4PL Rodbard or 4PL Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. Manual method:
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.
Determine the corresponding sample concentration from the standard curve by using the (mean) OD value for each sample.

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)	0.147
Standard 1 (31 U/mL)	0.515
Standard 2 (62 U/mL)	0.857
Standard 3 (125 U/mL)	1.423
Standard 4 (250 U/mL)	2.127

11 LIMITATIONS OF THE ASSAY

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.

Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results. 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.

High-Dose Hook Effect

"High-Dose Hook Effect" is not detected up to 5000 U/mL of ASA.

12 EXPECTED VALUES

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

In a study conducted with apparently healthy subjects, using the DIAsource Sperm Antibody ELISA the following data were observed:

Normal values	0 – 60 U/mL
Borderline	55 U/mL – 65 U/mL
Elevated values	> 60 U/mL

In the case of a value 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.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

Limit of Blank (LoB)	0.490 U/mL
Limit of Detection (LoD)	3.367 U/mL
Limit of Quantification (LoQ)	9.632 U/mL
Measuring range	3.367 U/mL – 250 U/mL
Linear range	13.333 mL – 250 U/mL

Reproducibility

Within-run Precision

The within-run precision was determined with 4 patient samples covering the complete measuring range within 20 days in 2 independent runs per day. CV was calculated as mean CV of 40 runs.

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)
1	40	39.68	3.9
2	40	77.99	3.0
3	40	106.16	4.2
4	40	155.95	3.9

Between-run Precision

The between-run precision was determined with 4 patient samples covering the complete measuring range within 20 days in 2 independent runs per day and with 2 replicates per run (20 x 2 x 2). CV was calculated from 80 determinations.

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)
1	80	39.68	11.2
2	80	77.99	8.7
3	80	106.16	11.4
4	80	151.86	13.1

Between-lot Precision

The between-lot variation was determined by 6 measurements of different samples with 3 different kit lots.

Sample	n	Mean (U/mL)	CV (%)
1	18	17.78	9.3
2	18	26.65	10.4
3	18	34.58	3.9
4	18	55.56	14.7

Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (U/mL)		10.86	34.93	38.34	45.42
Average Recovery (%)		98.6	89.0	101.0	105.0
Range of Recovery (%)	from	90.3	86.2	92.0	99.0
	to	114.4	93.1	111.3	109.5

Linearity

Samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Dilution Buffer*. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (U/mL)		36.37	66.20	183.74	280.32
Average Recovery (%)		105.7	95.1	103.2	104.7
Range of Recovery (%)	from	103.9	92.3	99.7	98.6
	to	107.5	97.9	110.8	107.3

14 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.

15 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

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 2022-05-19



SPERM ANTIBODY ELISA

ES

KAPD1826
DIAGNÓSTICO IN VITRO

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

1 NOMBRE Y FINALIDAD

El **DIAsource Sperm Antibody ELISA** es un inmunoensayo enzimático manual para realizar diagnósticos **cuantitativos** de anticuerpos dirigidos contra espermatozoides humanos (AAE) en suero humano.

Para uso diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional de laboratorio.

Para obtener más información sobre el uso previsto, consulte la versión en inglés de las instrucciones de uso

2 IMPORTANCIA CLÍNICA

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].

3 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DIAsource Sperm Antibody ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción 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.

4 REACTIVOS DEL KIT

Suficientes para 96 determinaciones.

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

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

Estándares del ELISA anticuerpo Espermático
N=1 to 4
4 viales, 0.5 ml
Estándar 1 (31 U/mL)
Estándar 2 (62 U/mL)
Estándar 3 (125 U/mL)
Estándar 4 (250 U/mL)
Listo para usar
- | | |
|----|-----|
| Ab | HRP |
|----|-----|

Enzima conjugado
1 vial, 8 ml
Anticuerpo anti-IgG humana conjugado con la peroxidasa de rábano
Listo para usar
- | | |
|-----|-----|
| DIL | BUF |
|-----|-----|

Tampón de Dilución
1 vial, 50 ml/vial, Listo para usar
también usado como blanco / Estándar cero / 0 U/mL
- | | |
|-------|-----|
| CHROM | TMB |
|-------|-----|

Solución Sustrato
1 vial, 14 ml
Listo para usar
solución de TMB
- | | |
|------|------|
| STOP | SOLN |
|------|------|

Solución de Parada
1 vial, 14 ml
0.5M H₂SO₄
- | | | |
|------|------|------|
| WASH | SOLN | CONC |
|------|------|------|

Solución de lavado (40x)
1 vial, 30 ml
- | | |
|---------|---|
| CONTROL | N |
|---------|---|

 Control
N=1, 1 vial, 0.5 ml, Listo para usar
- Soporte** para tiras sencillas

5 MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Un lector de placas de microtítulo calibrado (450 nm, con una longitud de onda de referencia de entre 620 nm y 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Incubadora a 37 °C
- Equipamiento manual o automático para lavar los pocillos de placa de microtítulo
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Cronómetro
- Papel cuadriculado o software para la reducción de datos.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este kit es exclusivo para diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional exclusivo de laboratorio.
2. Antes de iniciar el ensayo, lea todas las instrucciones de uso detenidamente. Utilice la versión en vigor de las instrucciones de uso suministradas junto con el kit. Asegúrese de que todo está claro.
3. No mezcle ni utilice componentes de kits con números de lote distintos. No es aconsejable intercambiar pocillos de placas diferentes, aun cuando pertenezcan al mismo lote. Puede que los kits se hayan enviado o almacenado en unas condiciones distintas y existe la posibilidad de que las características de unión de las placas sean ligeramente diferentes.
4. No use los reactivos una vez superada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit.
5. No reutilice los pocillos de microtítulo.
6. No use reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
7. Todos los reactivos incluidos en este kit son líquidos transparentes. La solución de sustrato es transparente e incolora. Cualquier cambio en su apariencia podría afectar al rendimiento de la prueba. Si así es, póngase en contacto con DIIAsource ImmunoAssays.
8. Una contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras podría arrojar resultados falsos.

9. Antes de iniciar la prueba, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (entre 20 °C y 26 °C). La temperatura afectará a las lecturas de densidad óptica del ensayo.
10. Todos los volúmenes indicados se deben respetar siguiendo el protocolo. Solo se obtendrán unos resultados de prueba óptimos si se usan pipetas calibradas y lectores de placas de microtítulo.
11. Utilice depósitos solo con reactivos únicos. Esto es especialmente cierto en el caso de los depósitos de sustratos. Si se usa un depósito para dispensar una solución de sustrato que ya se usó previamente con la solución de conjugado, la solución podría acabar tiznada. No vierta reactivo de nuevo a su vial original, ya que podría producirse una contaminación del reactivo

6.1 PRECAUCIONES GENERALES

1. Siga las buenas prácticas de laboratorio y las instrucciones de seguridad.
2. No pipetee nunca con la boca y evite el contacto con los reactivos y las muestras con la piel y las membranas mucosas.
3. No fume, coma, beba ni aplique sustancias cosméticas en las áreas de manipulación de muestras o reactivos del kit.
4. Utilice batas de laboratorio y guantes de látex desechables al manipular reactivos y, si fuera necesario, gafas protectoras también.

6.2 INFORMACION DE RIESGO BIOLÓGICO

1. Todos los reactivos de este kit de prueba que contienen plasma o suero humano se han analizado y se ha confirmado su negativo en HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados de la FDA. Pese a ello, no existe ningún método de prueba conocido que ofrezca garantía total de no presencia de agentes infecciosos.
2. El producto contiene materia de origen animal certificado como aparentemente libre de enfermedades contagiosas o infecciosas y parásitos nocivos.
3. Los componentes bovinos proceden de países en los que no se han notificado casos de EEB (encefalopatía espongiforme bovina).
4. Todas las materias y muestras de origen humano o animal deben tratarse como si existiera la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas.
5. La manipulación de material debe realizarse siguiendo los procedimientos establecidos según la normativa o instrucción de seguridad y riesgo biológico nacional pertinente. Los residuos deben desecharse respetando las normativas o regulaciones locales correspondientes.

7 INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antes de usarlos, espere a que todos los reactivos y la cantidad de bandas necesaria estén a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Solución de lavado

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
-------------------------------	---------------------	----------

8 INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO E INFORMACIÓN DE VIDA EN ESTANTERÍA

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.

9 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En este ensayo pueden ser usados los tipos de muestra detallados a continuación:

Suero humano.

En el ensayo no deben usarse muestras que contengan azida de sodio.

En términos generales, absténgase de usar muestras hemolíticas, lipémicas o con ictericia. Para obtener más información, consulte el capítulo «Sustancias interferentes».

Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben almacenarse cerradas herméticamente antes de realizar el ensayo. Si se van a almacenar congeladas, se pueden congelar solo una vez. Las muestras descongeladas se deben invertir varias veces antes de analizarlas

Estabilidad	entre 2 °C y 8 °C	4 días
	a -20 °C (en alícuotas)	hasta 2 meses

Dilución de las muestras

Antes de ensayar, diluya la muestra de cada paciente 1:100 con tampón de dilución (*Dilution Buffer*).

Ejemplo:

Dilución 1:100: 5 µL muestra + 495 µL *Dilution Buffer* (mezclar totalmente)

Estabilidad de las muestras diluidas	entre 2 °C y 8 °C	4 días
	a -20 °C (en alícuotas)	7 días

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

10 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

10.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente (entre 20 °C y 26 °C) antes de usarlos.
- Todos los reactivos deben mezclarse sin que generen espuma intercambie los tapones de los viales de reactivo para evitar posibles contaminaciones cruzadas.
- Use puntas de pipeta de plástico desechables nuevas con cada estándar, control o muestra para evitar posibles contaminaciones por arrastre.
- Para evitar posibles contaminaciones cruzadas y resultados engañosamente elevados, pipetee las muestras de paciente y dispense conjugado sin salpicar de forma minuciosa en el fondo de los pocillos
- Mezcle bien el contenido de los pocillos de la placa de microtítulo para procurar que los resultados de la prueba sean correctos.
- No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; añada reactivo inmediatamente una vez acabados los pasos de enjuagado.
- Una vez iniciada la prueba, todos los pasos se deben completar de forma ininterrumpida y en la misma secuencia de cada paso.
- La reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- La densidad óptica es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Es importante respetar los tiempos y las temperaturas de incubación que se indican en el capítulo «Procedimiento de la prueba».
- Antes de iniciar el ensayo, se recomienda tener todos los reactivos listos, los tapones quitados, todos los pocillos necesarios fijados en el soporte, etc. De este modo, se asegurará de que el tiempo que va a transcurrir en cada paso de pipeteo es el mismo y sin interrupción alguna.
- Durante la incubación a 37 °C, cubra las bandas de microtítulo con lámina de cubierta para evitar la evaporación.
- **Nota importante sobre el procedimiento de lavado:**
El lavado es tremendamente importante. Con unos pocillos mal lavados se obtendrán resultados engañosos. La sensibilidad y la precisión de este ensayo dependen enormemente de un correcto rendimiento del procedimiento de lavado.
- **Rendimiento de pruebas mediante aparatos de análisis completamente automáticos:**
Se puede obtener un rendimiento de pruebas automático usando aparatos de análisis de sistema abierto y completamente automáticos. Sin embargo, la combinación debe estar validada por el usuario.

10.2 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 incubardurante **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 **30 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. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura) y a 620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

10.3. Cálculo de los Resultados

1. La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar. Los estándares ya están prediluidos, por lo que no se ha tenido en cuenta la dilución de 1:100 de las muestras para el cálculo final de las concentraciones de las muestras.
2. Para determinar los duplicados, se debe hacer la media de los dos valores de densidad óptica (DO) de cada estándar, cada control y cada muestra de paciente. Si estos dos valores se desvían considerablemente el uno de otro, DIAsource recomienda volver a analizar las muestras.
3. Las muestras con concentraciones por encima del estándar más alto se pueden seguir diluyendo con Dilution Buffer y volver a analizarse según se describe en «Procedimiento de la prueba», o bien comunicarse como > 250 U/mL. En el cálculo de las concentraciones se debe tener en cuenta este factor de dilución.
4. Método automático:
Los resultados de estas instrucciones de uso se han calculado automáticamente mediante un ajuste de curva de una función logística de cuatro parámetros (4PL). (Los métodos de preferencia son 4PL Rodbard o 4PL Marquardt.) Otras funciones de reducción de datos podrían arrojar resultados ligeramente distintos.
5. Método manual:
Usando un papel cuadrulado, construya una curva estándar trazando el valor medio de densidad óptica obtenido de cada estándar en comparación con su concentración con un valor de densidad óptica en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X). Determine la concentración de muestra correspondiente de la curva estándar usando el valor medio de densidad óptica de cada muestra.

Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no se pueden usar como reemplazo de las generaciones de datos en el momento de realizar el ensayo.

Estándares	Densidad óptica (450 nm)
Zero Standard (0 U/mL)	0,147
Standard 1 (31 U/mL)	0,515
Standard 2 (62 U/mL)	0,857
Standard 3 (125 U/mL)	1,423
Standard 4 (250 U/mL)	2,127

10 LIMITACIONES DEL ENSAYO

Se obtendrán unos resultados fiables y reproducibles si el procedimiento de ensayo se lleva a cabo habiendo comprendido completamente las instrucciones de uso y poniendo en marcha unas buenas prácticas de laboratorio. Manipular las muestras de forma indebida o alterar esta prueba podría influir en los resultados.

Sustancias interferentes

La hemoglobina (hasta 4 mg/mL), la bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y los triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no tienen efecto alguno en los resultados del ensayo.

No debe utilizarse suero de pacientes con enfermedades de hígado.

Los resultados pueden estar afectados severamente por ciertas condiciones patológicas, como gammopatías poli- y monoclonal, enfermedades auto inmunes o por un estado inmune alterado.

Efecto gancho en concentraciones elevadas

No se aprecia ningún efecto gancho en concentraciones elevadas de hasta 5000 U/mL de AAE.

VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales. Un estudio realizado con sujetos aparentemente sanos en el que se usó DIASource Sperm Antibody ELISA reveló lo siguiente:

Valores normales	0 - 60 U/mL
Límite	55 U/mL - 65 U/mL
Valores elevados	> 60 U/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.

11 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Sensibilidad

Límite de blanco (LoB)	0,490 U/mL
Límite de detección (LoD)	3,367 U/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	9,632 U/mL
Intervalo de medición	3,367 U/mL - 250 U/mL
Intervalo lineal	4,333 U/mL - 250 U/mL

Reproducibilidad (precisión)

Recuperación

Linealidad

en la versión en inglés detallada de las instrucciones de uso.

12 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 DIASource directamente.

13 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

Revision date : 2022-05-19