

Product information

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



Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA



DE1020



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, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.**

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior:	
5.2 Samples Storage:	Stability at -20 °C increased to 12 months (old: 2 months);
5.3 Sample Preparation:	For diluted samples stability at -20 °C increased to 8 months (old: 7 days);
6.2 Test Procedure:	In step 4 number of wash cycles increased from 3 times to 5 times.
7 REFERENCE VALUES:	Updated.
9.1 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)	Added
9.2 Detection Capability:	Renamed (old: Sensitivity), complete new data;
9.3 Repeatability, Reproducibility:	Renamed (old: "Reproducibility")
9.4 Recovery:	New data.
9.5 Linearity:	New data.
10.1 Interfering Substances:	Several subchapters with additional information added.
12 LITERATURE:	Ref # 16 added.
General changes:	"0.5 M H ₂ SO ₄ " replaced by "< 5 % H ₂ SO ₄ "

ENGLISH.....	3
DEUTSCH	12
ITALIANO	21
ESPAÑOL.....	30
LITERATURE	39

1 INTENDED USE

The **Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA** is a manual enzyme immunoassay for the **quantitative** measurement of antibodies directed against human spermatozoa (ASA) in human serum.

For *in vitro* diagnostic use. For laboratory professional use.

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.

1.1 Scientific Validity Report

Antibodies directed against spermatozoa antigens may cause infertility in women or men. The application of the Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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. In addition, ASA can be detected in serum. 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 anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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 samples) 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

- 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 DEMEDITEC.
- 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.

General precautions

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

Biohazard information

- 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.
- The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
- Bovine components originate from countries where BSE (Bovine spongiform encephalopathy) has not been reported.
- All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
- 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.

Information to chemical hazards and hazard classification

- Some reagents contain preservatives in non-declarable concentrations. Nevertheless, in case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- Substrate Solution contains an ingredient in non-declarable concentrations which causes serious eye irritation. In case of possible contact with eyes, rinse immediately carefully and thoroughly with eye wash or water. After contact with skin, wash with plenty of water. Take-off contaminated clothing and wash it before reuse.
- Avoid contact with Stop Solution containing < 5 % H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Chemicals and prepared or used reagents must be treated as hazardous waste according to the national safety guideline or regulation.
- This product does not contain substances which have carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR) properties.

All reagents of this test kit do NOT contain hazardous substances in concentrations to be declared, a classification and labelling is not required.

For detailed information, please refer to the Safety Data Sheet, which is available upon request directly from DEMEDITEC.

4 MATERIALS

4.1 Materials provided with the kit

- SORB MT** Microtiterwells, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with a mix of spermatozoa proteins
- DIL** Dilution Buffer / Zero Standard, 1 vial, 50 mL, ready to use;
Concentration: 0 U/mL; Contains non-mercury preservative.
- CAL 1 – 4** Standard (Standard 1 - 4), 4 vials, 0.5 mL each, ready to use;
Concentrations: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL; Contain non-mercury preservative.
- CONTROL** Quality Control, 1 vial, 0.5 mL each, ready to use; For control values and ranges please refer to Certificate of Analysis (CoA). Contain non-mercury preservative.
- ENZ CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 8 mL, ready to use; Anti-human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.
- SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
- STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 14 mL, 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 vial, 30 mL (40X concentrated); See “Reagent Preparation”.
- Cover foil, Instruction for Use (IFU) and Certificate of Analysis (CoA)

4.2 Materials required but not provided

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

4.3 Storage and Stability of the Kit

Unopened kits and reagents as well as **opened reagents** must be stored at 2 °C to 8 °C.

The microtiter plate contains snap-off strips. Do not open the pouch of the wells until it reaches room temperature. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch including the desiccant and used in the plate frame provided. Once the foil bag has been opened, care must be taken to close it tightly again.

Once opened, reagent vials must be closed tightly again.

	Storage Temperature	Stability
Unopened kits and unopened reagents	2 °C to 8 °C	Until the expiration date printed on the label. Do not use reagents beyond this date!
Opened kit	2 °C to 8 °C	8 weeks

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 must not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they must be disposed of according to the official regulations.

5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE 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*".

For the determination of anti-spermatozoa antibodies in seminal plasma please use our Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) seminal ELISA (REF DE1021).

5.1 Sample 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.

Whole blood should not be frozen before centrifugation.

5.2 Samples Storage

Samples must be stored tightly capped prior to performing the assay. If stored frozen, freeze only once. Thawed samples must be inverted several times prior to testing.

Stability	at 2 °C to 8 °C	4 days
	at -20 °C (in aliquots)	up to 12 months

5.3 Sample Preparation

Prior to assaying, dilute each patient sample **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)	8 months

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

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 Procedural Notes

- 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.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

The controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They must be assayed with each test run.

The given test procedure describes manual processing.

Important note: The accuracy of this assay is markedly influenced by the correct incubation temperature and incubation time.
Pipetting the samples should not exceed 15 minutes.

1. Secure the desired number of microtiter wells in the frame holder.
2. Pipette **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. Wash the wells as follows:
If the wash step is performed manually:
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.

If an automated plate washer is used:

Rinse the wells **5 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well.

At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets!

5. Add **50 µL Enzyme Conjugate** into each well.
6. Cover with foil and incubate for **30 minutes** at **37 °C**.
7. Wash as described in step 4.
8. Pipette **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. 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, DEMEDITEC 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.

6.4 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)
<i>Zero Standard</i> (0 U/mL)	0.147
<i>Standard 1</i> (31 U/mL)	0.515
<i>Standard 2</i> (62 U/mL)	0.857
<i>Standard 3</i> (125 U/mL)	1.423
<i>Standard 4</i> (250 U/mL)	2.127

7 REFERENCE VALUES

The values are only for user's guidance. It is strongly recommended for each laboratory to establish its own specific values that take into consideration a population indigenous to the area where the laboratory is located. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results must be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

In a study conducted with apparently healthy subjects, using the Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA the following data were observed:

Cut-off value	60 U/mL
Normal values	< 55 U/mL
Grey zone	55 U/mL – 70 U/mL
Elevated values	> 70 U/mL

In the case of a value in the grey zone (55 U/mL to 70 U/mL) we recommend a follow-up determination with a new sample within the next two weeks.

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 Quality Control Laboratory are stated in the Certificate of Analyses (CoA) added to the kit. The values and ranges stated on the CoA always refer to the current kit lot and must be used for direct comparison of the results.

If available, it is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Apply appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not agree with 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 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

Until today, no substances are known to us, which have an influence to the measurement of Sperm Antibody in a sample.

9.2 Detection Capability

Limit of Blank (LoB)	5.440 U/mL
Limit of Detection (LoD)	8.553 U/mL
Limit of Quantification (LoQ)	12.386 U/mL
Measuring range	8.553 U/mL – 250 U/mL
Linear range	8.553 U/mL – 250 U/mL

9.3 Repeatability, Reproducibility

Designed according to CLSI guideline EP5 A3:2014.

9.3.1 Repeatability

Determined with 4 samples covering the complete measuring range within 20 days in 2 independent runs per day. CV was calculated as mean CV of 40 runs. CV must be < 10 %.

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

9.3.2 Reproducibility (Between-run)

Determined with 4 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. CV must be < 15 %.

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

9.3.3 Reproducibility (Between-lot)

Determined by 6 measurements of different samples with 3 different kit lots. CV must be < 15 %.

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

9.4 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. Acceptance range for recovery: 85 % to 115 %.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Highest concentration added (U/mL)	24.76	24.76	24.76	24.76
Concentration (U/mL)	32.88	57.97	25.25	56.85
Average Recovery (%)	98.1	103.2	100.0	97.3
Range of Recovery (%)	from	93.5	91.6	89.2
	to	102.5	109.1	108.6

9.5 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. Acceptance range for recovery: 85 % to 115 %.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 4
Highest Dilution	1:4	1:8	1:256	1:2	1:64
Concentration (U/mL)	79.03	162.20	217.33	216.49	444.36
Average Recovery (%)	101.2	99.9	93.4	102.4	93.4
Range of Recovery (%)	from	92.7	90.0	92.5	95.4
	to	109.6	112.3	94.1	108.4

10 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

10.1 Interfering Substances

10.1.1 Matrix Interference

No interference (bias < ± 20 %) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Bilirubin, unconjugated	0.5 mg/mL
Hemoglobin	4 mg/mL
Triglyceride	7.5 mg/mL

10.1.2 Heterophilic Antibody Interference

This test is designed to minimize the influence of heterophilic antibodies by appropriate, high stringency sample diluent and 100-fold dilution of each sample. Nevertheless, complete suppression of their effects cannot be guaranteed (16).

10.1.3 Autoantibody Interference

Patient samples containing autoimmune diseases on average may show slightly increased mean values depending on the disease type. In consequence, more samples may be found within the grey-zone of the assay. This test is designed to minimize the influence of autoantibodies by appropriate, high stringency sample diluent and 100-fold dilution of each sample. Nevertheless, complete suppression of autoantibody effects cannot be guaranteed (16).

10.1.4 Drug Interference

To date, we are not aware of any substance (drug) that could have an influence on the results of this assay.

10.2 High-Dose Hook Effect

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

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. If there is any doubt or concern regarding a result, 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.

11.4 Reporting of Serious Incident

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA** ist ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Messung von Antikörpern gegen Spermatozoen (ASA) in humanem Serum.

Für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik. Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

Das Produkt ist als Hilfsmittel für die Diagnose von immunologisch bedingten Fruchtbarkeitsstörungen bestimmt.

Das Produkt ist **nicht** für den Nachweis von poly- und monoklonalen Gammopathien bestimmt.

1.1 Wissenschaftliche Validitätsreport

Antikörper, die gegen Spermatozoen-Antigene gerichtet sind, können Unfruchtbarkeit bei Frauen oder Männern verursachen. Die Anwendung des Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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. Weiterhin können sie im Serum nachgewiesen werden. 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 Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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 Immunglobulin-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 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.
- Bevor Sie mit dem Test beginnen, lesen Sie die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig durch. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass Sie alles verstanden haben.
- Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Vertiefungen verschiedener Platten, auch aus derselben Charge, sollten nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen transportiert oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leichte Unterschiede aufweisen kann.
- Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Mikrotitervertiefungen nicht wiederverwenden.
- Reagenzien anderer Hersteller dürfen nicht zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Alle Reagenzien dieses Kits sind klare Lösungen, die Substratlösung ist klar und farblos. Veränderungen des Aussehens können die Durchführung des Tests beeinträchtigen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an DEMEDITEC.
- Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Geben Sie keine Reagenzien zurück in die Originalfläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Befolgen Sie die gute Laborpraxis und die Sicherheitsrichtlinien.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In Bereichen, in denen mit Kitbestandteilen oder Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborkittel und Einweg-Latexhandschuhe sowie, falls erforderlich, eine Schutzbrille zu tragen.

Informationen zur biologischen Gefährdung

- 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. Kein bekanntes Testverfahren kann jedoch mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass kein Infektionserreger vorhanden ist.
- Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädigenden Parasiten ist.
- Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen keine BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) gemeldet wurde.
- Alle Materialien und Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen so behandelt werden, als ob sie ansteckende Krankheiten übertragen könnten.
- Die Handhabung muss in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für Biogefährdung und Sicherheit festgelegt sind. Abfälle müssen gemäß den lokalen Regeln und Vorschriften entsorgt werden.

Informationen zu chemischen Gefahren und zur Gefahreinstufung

- Einige Reagenzien enthalten Konservierungsmittel in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentrationen. Bei Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder der Haut dennoch sofort mit ausreichend Wasser spülen.

- Die Substratlösung enthält einen Inhaltsstoff in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentration, der schwere Augenreizungen verursacht. Bei möglichem Kontakt mit den Augen sofort sorgfältig und gründlich mit Augenspülung oder Wasser spülen. Bei Berührung mit der Haut mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen.
- Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) vermeiden, da sie < 5 % H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Chemikalien und zubereitete oder gebrauchte Reagenzien müssen als gefährlicher Abfall gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften behandelt werden.
- Dieses Produkt enthält keine Stoffe, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften (CMR) haben.

Alle Reagenzien dieses Testkits enthalten KEINE gefährlichen Stoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen, eine Einstufung und Kennzeichnung ist nicht erforderlich.
Ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt, das Sie auf Anfrage direkt bei DEMEDITEC erhalten.

4 MATERIALIEN

4.1 Im Kit mitgelieferte Materialien

1. **SORB MT** Microtiterwells, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit Spermatozoen-Antigenen beschichtet.
2. **DIL** Dilution Buffer / Zero Standard (Probenverdunnungsmedium / Nullstandard), 1 Fläschchen, 50 mL, gebrauchsfertig; Konzentration: 0 U/mL
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CAL 1 – 4** Standard (Standard 1 - 4), 4 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **CONTROL** Quality Control (Kontrolle), 1 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig;
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem „Certificate of Analysis“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 8 mL, gebrauchsfertig;
Anti-Human-IgG-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **SUB TMB** Substrate Solution (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
7. **STOP SOLN** Stop Solution (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält < 5 % H₂SO₄, Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH SOLN 40x** Wash Solution (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
9. Abdeckfolie, Gebrauchsanweisung (IFU) und Analysenzertifikat (CoA)

4.2 Erforderliche, aber nicht enthaltene Materialien

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

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Ungeöffnete Kits und Reagenzien sowie **geöffnete Reagenzien** müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterplatte enthält abbrechbare Streifen. Öffnen Sie den Beutel mit den Vertiefungen erst, wenn er Raumtemperatur erreicht hat. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel mit dem Trockenmittel gelagert und in dem mitgelieferten Plattenrahmen verwendet werden. Nach dem Öffnen des Folienbeutels muss darauf geachtet werden, dass dieser wieder dicht verschlossen wird.

Einmal geöffnete Reagenzfläschchen müssen wieder fest verschlossen werden.

	Lagerungstemperatur	Stabilität
Ungeöffneter Kit und ungeöffnete Reagenzien	2 °C bis 8 °C	Bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Reagenzien nach Ablauf dieses Datums nicht mehr verwenden!
Geöffneter Kit	2 °C bis 8 °C	8 Wochen

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und die benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) bringen.

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 ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Das folgende Probenmaterial kann in diesem Test eingesetzt werden:

Humanes Serum

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

Zur Bestimmung von *anti-Spermatozoen-Antikörpern in Seminalplasma* verwenden Sie bitte den *Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) seminal ELISA (REF DE1021)*.

5.1 Probenentnahme

Serum: Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern. Vollblut sollte vor der Zentrifugation nicht eingefroren werden.

5.2 Probenlagerung

Die Proben müssen bis zur Durchführung des Tests fest verschlossen aufbewahrt werden. Wenn sie gefroren gelagert werden, nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben müssen vor dem Test mehrmals geschwenkt werden.

Stabilität:	bei 2 °C bis 8 °C	4 Tage
	bei -20 °C (in Aliquoten)	bis zu 12 Monate

5.3 Probenvorbereitung

Vor Einsatz im Test müssen die Patientenproben **1:100** mit *Dilution Buffer* verdünnt werden.

Beispiel:

Verdünnung 1:100: 5 µL Probe + 495 µL *Dilution Buffer* gründlich mischen)

Stabilität	der	bei 2 °C bis 8 °C	4 Tage
verdünnten Probe:		bei -20 °C (in Aliquoten)	8 Monate

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

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Hinweise zur Durchführung

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.
- Alle Reagenzien müssen ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Die Kappen der Reagenzfläschchen dürfen nicht vertauscht werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Einweg-Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten.
- Kavitäten während der Testdurchführung nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
- Sobald der Test begonnen wurde, müssen alle Schritte ohne Unterbrechung und in der gleichen Reihenfolge für jeden Schritt abgeschlossen werden.
- Die enzymatische Reaktion ist linear proportional zu Zeit und Temperatur.
- Die optische Dichte ist eine Funktion der Inkubationszeit und -temperatur. Die in Kapitel "Testverfahren" angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten werden.
- Es wird empfohlen, 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, usw. Nur eine solche Vorbereitung garantiert für jeden Pipettierschritt gleiche Zeiten ohne Unterbrechung.
- Während der Inkubation bei 37 °C die Mikrotiterstreifen mit Folie abdecken, um Verdunstung zu vermeiden.
- **Wichtiger Hinweis zum Waschvorgang:**
Das Waschen ist entscheidend. Unsachgemäß gewaschene Kavitäten führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschriffes!
- **Testdurchführung mit vollautomatischen Analysegeräten:**
Eine automatisierte Testdurchführung mit vollautomatischen, systemoffenen Analysegeräten ist möglich. Die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

Die Kontrollen dienen der internen Überprüfung der Zuverlässigkeit des Testverfahrens. Sie müssen bei jedem Testdurchlauf gemessen werden.

Das angegebene Testverfahren beschreibt die manuelle Abarbeitung.

Wichtiger Hinweis: Die Genauigkeit dieses Tests wird maßgeblich durch die korrekte Inkubationstemperatur und -zeit beeinflusst!

Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 15 Minuten dauern.

1. Die benötigte Anzahl der Mikrotiter-Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL Zero Standard, Standard, Quality Control** und **verdünnte Probe** mit neuen **Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. Mit Folie abdecken und **60 Minuten** bei **37 °C** inkubieren.
4. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
Wenn der Waschschrift **manuell** durchgeführt wird:
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **5-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Bei Verwendung eines **Waschautomaten**:

Wells **5-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Am Ende des Waschschrifts die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.

5. **50 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well zugeben.
6. Mit Folie abdecken und **30 Minuten** bei **37 °C** inkubieren.
7. Waschschrift durchführen wie in Schritt 4 beschrieben.
8. **50 µL Substrate Solution** in jedes Well pipettieren.
9. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
11. Die Optische Dichte (OD) der Lösung in jedem Well bei **450 nm (Messwellenlänge) und 620 nm oder 630 nm (Referenzwellenlänge für die empfohlene Hintergrundsubtraktion)** mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmen.
Es wird empfohlen, die Vertiefungen **innerhalb von 10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung abzulesen.

6.3 Berechnung der Ergebnisse

1. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Die Standards sind bereits vorverdünnt, daher darf die 1:100-Verdünnung der Proben bei der endgültigen Berechnung der Probenkonzentrationen nicht berücksichtigt werden.
2. Bei Doppelbestimmungen muss für jeden Standard, jede Kontrolle und Patientenproben der Mittelwert der beiden OD-Werte verwendet werden. Weichen die beiden Werte erheblich voneinander ab, empfiehlt die DEMEDITEC, die Proben erneut zu testen.
3. Proben mit Konzentrationen, die den höchsten Standard überschreiten, können mit *Dilution Buffer* weiter verdünnt und wie unter "Testdurchführung" beschrieben erneut gemessen werden oder müssen als **> 250 U/mL** angegeben werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.
4. Automatische Methode:
Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Ergebnisse 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. Manuelle Methode:
Erstellen Sie unter Verwendung von Millimeterpapier eine Standardkurve, indem Sie die (mittlere) OD jedes Standards gegen seine Konzentration auftragen, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse liegt. Bestimmen Sie die entsprechende Probenkonzentration anhand der Standardkurve, indem Sie den (mittleren) OD-Wert für jede Probe verwenden.

6.3.1 Beispiel einer typischen Standardkurve

Die folgenden Daten dienen nur zur Orientierung und dürfen **nicht** anstelle der Datengenerierung zum Zeitpunkt des Tests verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (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

7 REFERENZWERTE

Die Werte dienen lediglich als Orientierungshilfe für den Anwender. Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen spezifischen Werte festlegt, die eine Bevölkerung berücksichtigen, die aus dem Gebiet stammt, in dem sich das Labor befindet. 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.

In einer Studie mit dem DEMEDITEC Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Cut-off-Wert 60 U/mL
 Normalbereich < 55 U/mL
 Grauzone 55 U/mL – 70 U/mL
 Erhöhte Werte > 70 U/mL

Bei einem Wert in der Grauzone (55 U/mL bis 70 U/mL) empfehlen wir eine Nachbestimmung mit einer neuen Probe, die innerhalb der nächsten zwei Wochen entnommen wird.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Gute Laborpraxis erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen sollte gemessen werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln und damit eine korrekte Testdurchführung zu gewährleisten.

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 Analysenzertifikat (CoA), das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im CoA angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollen zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Falls verfügbar, wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungsprogrammen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontrollwerten 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, Verfallsdaten der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler erkennbar sein, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 LEISTUNGSMERKMALE**9.1 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)**

Zurzeit sind uns keine Substanzen bekannt, die einen Einfluss auf die Bestimmung von ASA in einer Probe haben.

9.2 Detektionsfähigkeit

„Limit of Blank“ (LoB)	5,440 U/mL
Nachweisgrenze (LoD)	8,553 U/mL
Quantifizierungsgrenze (LoQ)	12,386 U/mL
Messbereich	8,553 U/mL – 250 U/mL
Linearer Bereich	8,553 U/mL – 250 U/mL

Die Daten zu:

9.3 Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit**9.4 Wiederfindung****9.5 Linearität**

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES VERFAHRENS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Gebrauchsanweisung und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Handhabung der Proben oder eine Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferierende Substanzen**10.1.1 Matrix-Interferenz**

Bis zu der in der nachstehenden Tabelle angegebenen Konzentration wurde bei Zugabe des Störstoffs keine Interferenz ("Bias" < $\pm 20\%$) festgestellt.

Bilirubin unkonjugiert	0,5 mg/mL
Hämoglobin	4 mg/mL
Triglyceride	7,5 mg/mL

10.1.2 Interferenz mit heterophilen Antikörpern

Dieser Test ist so konzipiert, dass der Einfluss heterophiler Antikörper durch die Verwendung eines Probenverdünnungsmittels mit hoher Stringenz minimiert wird. Dennoch kann eine vollständige Unterdrückung ihrer Auswirkungen nicht garantiert werden (16).

10.1.3 Interferenz mit Autoantikörpern

Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen können je nach Art der Erkrankung im Durchschnitt leicht erhöhte Mittelwerte aufweisen. Infolgedessen können mehr Proben innerhalb der Grauzone des Tests gefunden werden. Dieser Test ist so konzipiert, dass der Einfluss von Autoantikörpern durch ein geeignetes, hochstringentes Probenverdünnungsmittel und eine 100-fache Verdünnung der einzelnen Proben minimiert wird. Dennoch kann eine vollständige Unterdrückung von Autoantikörper-Effekten nicht garantiert werden (16).

10.1.4 Beeinflussung durch Medikamente

Zurzeit sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt, die einen Einfluss auf die Ergebnisse dieses Tests haben könnten

10.2 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 5000 U/mL an ASA nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Anwender die Regeln der GLP (Gute Laborpraxis) oder andere anwendbare nationale Normen und/oder Gesetze strikt einhalten. 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 mitzuführen.

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 bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken bestehen, 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.

11.4 Meldung von schwerwiegenden Vorkommnissen

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

1 DESTINAZIONE D'USO

Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA è un test immunoenzimatico manuale per la misurazione **quantitativa** di anticorpi anti-spermatozoi umani (ASA) nel siero umano.

Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale di laboratorio.

Per ulteriori informazioni sulla destinazione d'uso, consultare le istruzioni per l'uso in inglese.

1.1 Validità scientifica

Gli anticorpi specifici per antigeni degli spermatozoi possono causare infertilità in donne e uomini. L'utilizzo del test Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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. È 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. Inoltre, possono essere rilevati nel siero. 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 Demeditec anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA è un dosaggio immuno-assorbente legato a un enzima a fase solida (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 (DO) del prodotto giallo risultante. L'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard; le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Questo kit è solo per uso diagnostico in vitro. Solo per uso professionale di laboratorio.
- Prima di avviare il dosaggio, leggere completamente e attentamente le istruzioni per l'uso. Utilizzare la versione valida delle istruzioni per l'uso fornita con il kit. Assicurarsi che tutto sia stato compreso.
- Non miscelare o utilizzare componenti provenienti da kit con un diverso numero di lotto. Si raccomanda di non scambiare pozzetti di piastre diverse, anche se dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati spediti o conservati in condizioni differenti e le caratteristiche di legame delle piastre potrebbero essere leggermente diverse.
- Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza riportata sulle etichette del kit.
- Non riutilizzare i pozzetti di microtitolazione.
- Non usare reagenti di altri produttori in combinazione con i reagenti di questo kit di test.
- Tutti i reagenti di questo kit sono liquidi trasparenti; la soluzione di substrato è trasparente e incolore. Modifiche nell'aspetto possono influenzare le prestazioni del test. In questo caso, contattare DEMEDITEC.
- La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare risultati falsi.
- Prima di avviare il test, attendere che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (da 20 °C a 26 °C). La temperatura influenza le letture della densità ottica del dosaggio. Tuttavia, i valori relativi ai campioni dei pazienti non verranno influenzati.
- Usare i volumi indicati secondo quanto previsto dal protocollo. I risultati ottimali del test si ottengono solo utilizzando pipette calibrate e lettori di piastre per microtitolazione.
- Utilizzare serbatoi solo per reagenti singoli. Ciò vale in particolare per i serbatoi per il substrato. L'utilizzo di un serbatoio per l'erogazione di una soluzione di substrato precedentemente usato per la soluzione di coniugato potrebbe causare una colorazione della soluzione. Non versare nuovamente i reagenti nelle fiale originali, poiché potrebbe verificarsi una contaminazione.

Precauzioni generali

- Seguire le linee guida relative alle buone prassi e alla sicurezza in laboratorio.
- Non pipettare mai a bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le mucose.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree dove vengono manipolati campioni o reagenti del kit.
- Quando si maneggiano campioni e reagenti, indossare camici da laboratorio e guanti in lattice monouso e occhiali di sicurezza ove necessario.

Informazioni sul rischio biologico

- Tutti i reagenti di questo kit che contengono siero o plasma umano sono stati testati e confermati negativi rispetto a HIV I/II, HBsAg e HCV usando procedure approvate dalla FDA. Tuttavia, nessun metodo noto può garantire con certezza assoluta che non sia presente alcun agente infettivo.
- Il dispositivo contiene materiale di origine animale, certificato come apparentemente privo di malattie infettive o contagiose e parassiti nocivi.
- I componenti bovini provengono da paesi in cui non è stata segnalata la BSE (Encefalopatia spongiforme bovina).
- Maneggiare tutti i materiali e i campioni di origine umana o animale come potenziali fonti di malattie infettive.
- Manipolare in conformità con le procedure definite dalle linee guida o dai regolamenti nazionali in materia di rischio biologico e sicurezza. Smaltire i rifiuti secondo le norme e i regolamenti locali.

Informazioni sul rischio chimico e sulla classificazione dei pericoli

- Alcuni reagenti contengono conservanti in concentrazioni non dichiarabili. Tuttavia, in caso di contatto con gli occhi o la pelle, sciacquare immediatamente con acqua.
- La soluzione di substrato contiene un ingrediente in concentrazioni non dichiarabili che provoca grave irritazione oculare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare subito accuratamente ed abbondantemente con una soluzione di lavaggio oculare o acqua. Dopo il contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli.
- Evitare il contatto con la soluzione di arresto contenente < 5 % H₂SO₄. Può provocare irritazioni e ustioni alla pelle.
- Trattare i prodotti chimici e i reagenti preparati o usati come rifiuti pericolosi secondo le linee guida o i regolamenti nazionali sulla sicurezza.
- Questo prodotto non contiene sostanze con proprietà cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR).

Tutti i reagenti di questo kit di test NON contengono sostanze pericolose in concentrazioni da dichiarare; non è richiesta una classificazione ed etichettatura. Per informazioni dettagliate fare riferimento alla Scheda di Sicurezza, disponibile su richiesta direttamente da DEMEDITEC.

4 MATERIALI

4.1 Materiali forniti nel kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropozetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con antigene spermatico; (incluso 1 pellicola sigillante)
2. **DIL Dilution Buffer / Zero Standard** (Diluente dei campioni / Standard zero), 1 flacone, 50 mL, pronto all'uso; Concentrazione: 0 U/mL; Contiene conservante senza mercurio.
3. **CAL 1 - 4 Standard (Standard 1 - 4)**, 4 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso; Concentrazione: 31 - 62 - 125 - 250 U/mL; Contiene conservante senza mercurio.
4. **CONTROL Quality Control** (Controllo), 1 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso; I valori dei controlli sono indicati sulla „Certificate of Analysis“. Contiene conservante senza mercurio.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 8 mL, pronto all'uso; Anticorpo IgG anti-umano coniugato alla perossidasi di rafano. Contiene conservante senza mercurio.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; Contiene < 5 % 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 (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.
9. Pellicola sigillante, Istruzioni per l'uso (IFU), Certificato di analisi (CoA)

4.2 Materiali necessari ma non forniti

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

4.3 Conservazione e stabilità del kit

I kit e i reagenti non aperti e i reagenti aperti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

La piastra per microtitolazione contiene strisce staccabili. Non aprire il sacchetto dei pozzetti finché non raggiunge la temperatura ambiente. I pozzetti inutilizzati devono essere conservati tra 2 °C e 8 °C nel sacchetto di alluminio sigillato con dentro l'essiccante e devono essere utilizzati nel telaio fornito. Dopo l'apertura, il sacchetto di alluminio deve essere chiuso ermeticamente e con la massima cura.

Dopo l'apertura, le fiale di reagente devono essere nuovamente chiuse ermeticamente.

	Temperatura di conservazione	Stabilità
Kit non aperto e reagenti non aperti	2 °C a 8 °C	Fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Non utilizzare i reagenti dopo questa data!
Kit aperti	2 °C a 8 °C	8 settimane

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).

Soluzione di lavaggio

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

Lo smaltimento del kit e di tutti i materiali/reagenti usati deve essere effettuato nel rispetto delle normative nazionali. Informazioni specifiche su questo prodotto sono riportate nella Scheda di Sicurezza, sezione 13.

4.6 Kit di test danneggiati

In caso di danni al kit del test o ai componenti, DEMEDITEC deve essere informato per iscritto, al più tardi una settimana dopo la ricezione del kit. I singoli componenti danneggiati non devono essere utilizzati per i test. Devono essere invece conservati fino a quando non è stata individuata una soluzione definitiva. Successivamente potranno essere smaltiti secondo le norme in vigore.

5 PRELIEVO, CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

In questo test è possibile utilizzare il seguente materiale campione:

Siero umano

Campioni contenenti azoturo di sodio non devono essere utilizzati nel dosaggio.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

Per la determinazione degli anticorpi anti-spermatozoi nel plasma seminale si prega di utilizzare il Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) seminal ELISA (REF DE1021).

5.1 Prelievo dei campioni

Siero: Prelevare il sangue mediante venipuntura (ad es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti in terapia anticoagulante potrebbero richiedere più tempo per la coagulazione. Il sangue intero non deve essere congelato prima della centrifugazione.

5.2 Conservazione dei campioni

I campioni devono essere conservati ben tappati prima di eseguire il dosaggio. Se vengono conservati in congelatore, congelarli solo una volta. I campioni scongelati devono essere invertiti più volte prima di eseguire il test.

Stabilità:	da 2 °C a 8 °C	4 giorni
	a -20 °C (in aliquote)	fino a 12 mesi

5.3 Preparazione dei campioni

Prima del dosaggio, diluire ogni campione paziente **1:100** con il tampone di diluizione.

Esempio:

diluizione 1:100: 5 µL campione + 495 µL *Dilution Buffer* (miscelare accuratamente)

Stabilità di campioni diluiti:	da 2 °C a 8 °C	4 giorni
	a -20 °C (in aliquote)	8 mesi

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

6 PROCEDURA DEL DOSAGGIO

6.1 Note sulla procedura

- Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (tra 20 °C e 26 °C) prima dell'uso.
- Miscelare tutti i reagenti senza formare schiuma.
- Non scambiare tra loro i tappi delle fiale di reagente per evitare contaminazioni incrociate.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare un nuovo puntale di pipettaggio in plastica monouso per evitare il carry-over.
- Per evitare la contaminazione incrociata e risultati falsamente elevati, pipettare i campioni dei pazienti e dispensare il coniugato accuratamente sul fondo dei pozzetti senza produrre schizzi.
- Per garantire risultati ottimali del test, mescolare accuratamente il contenuto dei pozzetti della piastra per microtitolazione.
- Non lasciare asciugare i pozzetti durante il dosaggio; aggiungere i reagenti subito dopo aver completato le fasi di risciacquo.
- Dopo l'avvio del test, completare tutti i passaggi senza interruzioni e seguendo la stessa sequenza per ogni passaggio.
- La reazione enzimatica è linearmente proporzionale al tempo e alla temperatura.
- La densità ottica è una funzione del tempo di incubazione e della temperatura. Rispettare i tempi e le temperature di incubazione come indicato nel capitolo "Procedura del test".
- Prima di avviare il dosaggio, è raccomandato fare in modo che tutti i reagenti siano pronti, i tappi rimossi, tutti i pozzetti necessari fissati sul supporto ecc. Questo garantirà un tempo trascorso identico per ogni fase di pipettaggio senza interruzioni.
- Durante l'incubazione a 37 °C coprire le strisce di microtitolazione con un foglio per evitare l'evaporazione.
- **Nota importante sulla procedura di lavaggio:**
Il lavaggio è fondamentale. I pozzetti lavati in modo improprio daranno risultati errati. La sensibilità e la precisione di questo dosaggio sono notevolmente influenzate dalla corretta esecuzione della procedura di lavaggio!
- **Prestazioni del test utilizzando dispositivi di analisi completamente automatizzati:**
È possibile eseguire test automatizzati utilizzando dispositivi di analisi a sistema aperto completamente automatizzati. Tuttavia, la combinazione deve essere convalidata dall'utente.

6.2 Procedura del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

I controlli servono come controlli interni per la valutazione dell'affidabilità della procedura del test. Essi devono essere dosati a ogni esecuzione del test.

La procedura del test indicata descrive l'elaborazione manuale.

Nota importante: l'accuratezza di questo dosaggio è notevolmente influenzata dalla corretta temperatura e dal tempo di incubazione.

Il pipettaggio dei campioni non deve superare i 15 minuti.

1. Fissare il numero desiderato di pozzetti di microtitolazione nel telaio di supporto.
2. Pipettare **50 µL** di ogni **Zero Standard, Standard, Quality Control, e campione diluiti** nei pozzetti appropriati, utilizzando puntali monouso.
3. Coprire con un foglio e incubare per **60 minuti a 37 °C**.
4. Lavare i pozzetti nel modo seguente:
Qualora la fase di lavaggio venga eseguita manualmente:
Agitare energicamente il contenuto dei pozzetti.
Risciacquare ogni pozzetto **5 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.

Qualora si usi un dispositivo di lavaggio di micropiastre automatizzato:

Risciacquare ogni pozzetto **5 volte** con **400 µL** di soluzione di lavaggio diluita.

Al termine della fase di lavaggio, scuotere sempre energicamente i pozzetti su carta assorbente per rimuovere le gocce residue.

5. Aggiungere **50 µL** di **Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
6. Coprire con un foglio e incubare per **30 minuti a 37 °C**.
7. Lavare come descritto al punto 4.
8. Pipettare **50 µL** di **Substrate Solution** in ogni pozzetto.
9. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
10. Arrestare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** di **Stop Solution** in 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 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 Calcolo dei risultati

1. La concentrazione dei campioni può essere letta direttamente dalla curva standard. Gli standard sono già pre-diluiti, pertanto la diluizione 1:100 dei campioni non deve essere presa in considerazione per il calcolo finale delle concentrazioni dei campioni.
2. Per le misurazioni duplicate, è necessario considerare la media dei due valori di densità ottica (DO) per ogni standard, controllo e campione di paziente. Se i due valori si discostano sostanzialmente l'uno dall'altro, DEMEDITEC raccomanda di ritestare i campioni.
3. I campioni con concentrazioni superiori a quelle dello standard più elevato possono essere ulteriormente diluiti con Dilution Buffer e analizzati nuovamente secondo quanto descritto in "Procedura del test"; in alternativa, devono essere refertati come > 250 U/mL. Per il calcolo delle concentrazioni è necessario considerare questo fattore di diluizione.
4. Metodo automatizzato:
I risultati nelle istruzioni per l'uso sono stati calcolati automaticamente utilizzando un adattamento della curva logistica a quattro parametri (4PL). (I metodi preferiti sono 4PL Rodbard o 4PL Marquardt.) Altre funzioni di riduzione dei dati potrebbero dare risultati leggermente diversi.
5. Metodo manuale:
Utilizzando carta millimetrata, costruire una curva standard tracciando la (media) DO ottenuta da ogni standard contro la rispettiva concentrazione con il valore DO sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X). Determinare la concentrazione del campione corrispondente dalla curva standard utilizzando il valore OD (medio) per ogni campione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati vengono riportati a scopo esclusivamente dimostrativo e **non possono** sostituire i dati generati al momento di esecuzione del dosaggio.

Standard	Densità ottica (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

7 VALORI DI RIFERIMENTO

I valori vengono forniti solo come riferimento per l'utente.

Si consiglia vivamente a ciascun laboratorio di stabilire i propri valori specifici che tengano conto di una popolazione autoctona dell'area in cui si trova il laboratorio.

I risultati da soli non dovrebbero essere l'unico motivo per eventuali conseguenze terapeutiche.

Correlare i risultati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

In uno studio condotto su soggetti apparentemente sani, usando il test Demeditec anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum, sono stati osservati i seguenti risultati:

Valore Cut-off	60 U/mL
Valori normali	< 55 U/mL
Zona grigia	55 U/mL - 70 U/mL
Valori elevati	> 70 U/mL

Se il valore è nella zona grigia (da 55 U/mL a 70 U/mL), si consiglia di ripetere la determinazione con un nuovo campione raccolto entro le due settimane successive.

8 CONTROLLO DI QUALITÀ

Secondo le buone prassi di laboratorio, i controlli devono essere eseguiti per ogni curva standard. Un numero statisticamente significativo di controlli dovrebbe essere analizzato per stabilire i valori medi e gli intervalli accettabili per garantire prestazioni adeguate.

Si raccomanda di usare campioni di controllo secondo quanto previsto dalle norme locali o nazionali. Si consiglia di utilizzare campioni di controllo per garantire la validità giornaliera dei risultati. Utilizzare controlli sia a livelli normali che a livelli patologici.

I controlli e i corrispondenti risultati del Laboratorio di controllo qualità sono riportati nel Certificato di Analisi (CoA) inserito nel kit. I valori e gli intervalli indicati sul Certificato di analisi si riferiscono sempre al lotto del kit corrente e devono essere utilizzati per il confronto diretto dei risultati.

Se disponibili, si raccomanda inoltre di partecipare ai programmi nazionali o internazionali della valutazione della qualità per assicurare la precisione dei risultati.

Per analizzare i valori di controllo e gli andamenti, utilizzare metodi statistici appropriati. Se i risultati del dosaggio non si adattano agli intervalli di riferimento stabiliti per i controlli, i risultati dei pazienti non possono essere considerati validi.

In tal caso, verificare le seguenti aree tecniche: Dispositivi di pipettaggio e temporizzazione; fotometro, date di scadenza dei reagenti, condizioni di conservazione e incubazione, metodi di aspirazione e lavaggio.

Dopo aver verificato le voci sopra indicate senza riscontrare alcun errore, contattare il proprio distributore o direttamente DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

9.1 Specificità degli anticorpi (reattività incrociata)

Al momento non siamo a conoscenza di sostanze che influiscono sulla misurazione di ASA in un campione.

9.2 Sensibilità

Limite del bianco (LoB)	5,440 U/mL
Limite del bianco (LoD)	8,553 U/mL
Limite di quantificazione (LoQ)	12,386 U/mL
Intervallo di misurazione	8,553 U/mL - 250 U/mL
Intervallo lineare	8,553 U/mL – 250 U/mL

I dati relativi a:

9.3 Ripetibilità e Riproducibilità

9.4 Recupero

9.5 Linearità

sono riportati nella versione inglese dettagliata delle istruzioni per l'uso.

10 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Se si esegue la procedura del dosaggio con una completa comprensione delle istruzioni per l'uso e nel rispetto delle buone prassi di laboratorio, i risultati ottenuti saranno affidabili e riproducibili.

Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica di questo test potrebbe influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

10.1.1 Interferenza della matrice

Non è stata riscontrata alcuna interferenza (scostamento < $\pm 20\%$) per l'aggiunta dell'interferente fino alla concentrazione indicata nella tabella seguente.

Bilirubina non coniugata	0,5 mg/mL
Emoglobina	4 mg/mL
Trigliceridi	7,5 mg/mL

I dati relativi a:

10.1.2 Interferenza di anticorpi eterofili

10.1.3 Interferenza da autoanticorpi

sono riportati nella versione inglese dettagliata delle istruzioni per l'uso.

10.1.4 Matrix-Interferenz

Al momento non siamo a conoscenza di alcuna sostanza (farmaco) che possa influenzare i risultati di questo test.

10.2 Effetto gancio a dose elevata

Non viene rilevato alcun "Effetto gancio a dose elevata" fino a 5000 U/mL di anticorpi anti-spermatozoi.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo quanto previsto dalle istruzioni d'uso del produttore. Inoltre, l'utente deve attenersi rigorosamente alle norme delle buone prassi di laboratorio o ad altri standard nazionali e/o leggi in vigore. Questo è particolarmente importante per l'uso dei reagenti di controllo. È importante includere sempre, all'interno della procedura del test, un numero sufficiente di controlli per convalidare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono compresi negli intervalli specificati e se anche tutti gli altri parametri del test rientrano nelle specifiche del dosaggio. In caso di dubbi o preoccupazioni in relazione a un risultato, contattare DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non devono mai basarsi esclusivamente sui risultati di laboratorio, anche qualora tutti i risultati dei test concordino con gli elementi come indicato al punto 11.1. Qualsiasi risultato di laboratorio costituisce solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente.

Si dovrebbero trarre conseguenze terapeutiche solo nei casi in cui i risultati di laboratorio concordino in modo accettabile con il quadro clinico complessivo del paziente.

Il risultato del test, di per sé, non deve mai essere l'unico fattore determinante per una decisione terapeutica.

11.3 Responsabilità legali

Qualsiasi modifica del kit di test e/o scambio o miscela di qualsiasi componente di lotti diversi da un kit di test a un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati previsti e la validità del test nel suo complesso. Tali modifiche e/o scambi rendono nulla qualsiasi richiesta di sostituzione.

Anche i reclami presentati a causa di un'errata interpretazione da parte del cliente dei risultati di laboratorio indicati al punto 11.2 non saranno ritenuti validi.

In ogni caso, in caso di reclamo, la responsabilità del produttore non potrà superare il valore del kit di test. Il produttore non sarà responsabile di eventuali danni causati al kit di test durante il trasporto.

11.4 Segnalazione di incidenti gravi

Tutti gli incidenti gravi relativi a questo prodotto devono essere notificati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro di residenza dell'utente e/o del paziente.

1 FINALIDAD PREVISTA

El **Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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.

1.1 Validez científica

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos de espermatozoides pueden causar infertilidad en mujeres y hombres. Se recomienda el uso del Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum 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. Además, se pueden detectar en suero. 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 PRINCIPIO DEL TEST

El Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida basado en el **principio de 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). Tras un proceso de lavado para eliminar cualquier sustancia sin unir, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene añadiendo una solución de parada, y se realiza una medición de la densidad óptica (DO) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra. Se crea una curva estándar cotejando los valores de DO con las concentraciones de estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan usando esta curva estándar.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este kit es exclusivo para diagnóstico *in vitro*. Para uso profesional exclusivo de laboratorio.
- 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.
- 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.
- No use los reactivos una vez superada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas del kit.
- No reutilice los pocillos de microtítulo.
- No use reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
- 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 DEMEDITEC.
- Una contaminación microbiana de los reactivos o de las muestras podría arrojar resultados falsos.
- 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.
- 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.
- 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.

Precauciones generales

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

Información de riesgo biológico

- 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.
- El producto contiene materia de origen animal certificado como aparentemente libre de enfermedades contagiosas o infecciosas y parásitos nocivos.
- Los componentes bovinos proceden de países en los que no se han notificado casos de EEB (encefalopatía espongiforme bovina).
- Todas las materias y muestras de origen humano o animal deben tratarse como si existiera la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas.
- 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.

Información sobre riesgos químicos y la clasificación de riesgos

- Algunos reactivos contienen conservantes con niveles de concentración no declarables. Aún así, en caso de contacto con los ojos o la piel, enjuague de inmediato con agua.
- La solución de sustrato contiene un ingrediente con niveles de concentración no declarables que puede provocar irritaciones de los ojos graves. En caso de posible contacto con los ojos, enjuáguelos concienzudamente de inmediato con agua o con algún colirio. Tras un contacto con la piel, lave con abundante agua. Quítese la ropa contaminada y lávela antes de volver a utilizarla.
- Evite el contacto con una solución de parada que contenga < 5 % H₂SO₄. Puede provocar irritación cutánea o quemaduras.
- Los componentes químicos y los reactivos preparados o usados se deben tratar como desecho peligroso siguiendo la normativa o instrucción de seguridad nacional pertinente.
- Este producto no contiene sustancias con propiedades carcinogénicas, mutagénicas o tóxicas para la reproducción (CMR).

Los reactivos de este kit de prueba NO contienen sustancias peligrosas con niveles de concentración que deban declararse. No es necesario clasificarlo o etiquetarlo a tal efecto.

Para obtener información detallada, consulte la ficha de datos de seguridad, que puede solicitar directamente a DEMEDITEC.

4 MATERIAL

4.1 Material suministrado junto con el kit

- SORB MT Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con proteínas de espermatozoides (incl. 1 lámina de cierre)
- DIL Dilution Buffer / Zero Standard** (Solución para dilución de la muestra / Estándar cero), 1 vial, 50 mL, listo para usar; Concentración: 0 U/mL; Contiene conservante sin mercurio.
- CAL 1 – 4 Standard (Standard 1 - 4)**, (Estándar), 4 viales, 0,5 mL cada, listos para usar; Concentraciones: 31 – 62 – 125 – 250 U/mL Contiene conservante sin mercurio.
- CONTROL Quality Control** (Control), 1 vial, 0,5 mL cada, listos para usar; Referir los valores y rangos del control a la "Certificate of Analysis". Contiene conservante sin mercurio.
- ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 8 mL, listo para usar; Anticuerpo anti-IgG humana conjugado con la peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
- SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Tetrametilbencidina (TMB).
- STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Contiene < 5 % H₂SO₄, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
- WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X); Ver "Preparación de los Reactivos".
- Lámina de cubierta, Instrucciones de uso (IFU), Certificado de análisis (CoA)

4.2 Materiales necesarios 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

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Los reactivos y kits sin abrir, así como los reactivos abiertos, se deben almacenar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

La placa de microtítulo contiene bandas desprendibles. No abra la bolsa de los pocillos hasta que esté a temperatura ambiente. Los pocillos sin usar se deben almacenar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C en la bolsa de aluminio sellada junto con el desecante, y deben utilizarse en el bastidor indicado. Una vez abierta la bolsa de aluminio, hay que tener cuidado para volver a cerrarla herméticamente.

Una vez abiertos, los viales de reactivo se deben volver a cerrar herméticamente.

	Temperatura de almacenamiento	Estabilidad
Kit y reactivos sin abrir	2 °C a 8 °C	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta impresa. No use los reactivos una vez superada esta fecha.
Kit abierto	2 °C a 8 °C	8 semanas

4.4 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
-------------------------------	---------------------	----------

4.5 Eliminación del kit

El kit y todo los materiales/reactivos usados deberán desecharse siguiendo la regulación nacional correspondiente. En el apartado 13 de la ficha de datos de seguridad encontrará información general relativa a este producto.

4.6 Kits de prueba dañados

En caso de que el kit de prueba o alguno de sus componentes estén dañados, se deberá comunicar a DEMEDITEC por escrito como máximo una semana después de la recepción del kit. Los componentes dañados no deben usarse en ninguna serie de prueba. Deberán guardarse hasta que el asunto se resuelva. Tras ello, deberán desecharse siguiendo la regulación oficial en vigor.

5 TOMA DE LA MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN

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*».

Para la determinación de anticuerpos anti-espermatozoides en plasma seminal, utilice nuestro Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) seminal ELISA (REF DE1021)

5.1 Toma de muestras

Suero: Extraiga sangre mediante venipuntura (p. ej., Sarstedt Monovette para suero), deje que coagule y separe el suero mediante centrifugado a temperatura ambiente. No centrifugue hasta que la coagulación se realice por completo. Puede que las muestras de los pacientes sometidos a terapia anticoagulante necesiten más tiempo para coagularse. La sangre total no debe congelarse antes del centrifugado.

5.2 Almacenamiento de 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 12 meses

5.3 Preparación 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)	8 meses

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

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Notas sobre el procedimiento

- 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.
- No 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.

6.2 Procedimiento de la prueba

Cada serie debe incluir una curva estándar.

Los controles actúan como controles internos de la fiabilidad del procedimiento del test. Se deben analizar en cada serie de prueba.

El procedimiento de prueba aquí indicado describe un procesamiento manual.

Nota importante: La precisión de este ensayo depende enormemente de que haya una temperatura y un tiempo de incubación correctos.

El pipeteo de las muestras no debe superar los 15 minutos.

1. Fije la cantidad de pocillos de microtítulo que desee en el soporte del bastidor.
2. Pipetee **50 µL** de cada **Zero Standard**, **Standard**, cada **Quality Control** y cada **muestra diluida con puntas nuevas desechables** en los pocillos correspondientes.
3. Cubrir con un folio e incubar durante **60 minutos a 37 °C**.
4. Lave los pocillos del siguiente modo:
Si el paso de lavado se efectúa manualmente:
Agite enérgicamente el contenido de los pocillos.
Enjuague los pocillos **5 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.

Si se usa un aparato de lavado automático de placas:

Enjuague los pocillos **5 veces** con **400 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.

Al término de cada paso de lavado, frote bien los pocillos con papel absorbente para eliminar las gotas residuales!

5. Añada **50 µL** de **Enzyme Conjugate** en cada pocillo.
6. Cubrir con un folio e incube durante **30 minutos a a 37 °C**.
7. Lavar como se describe en el paso 4.
8. Pipetee **50 µL** de **Substrate Solution** en cada pocillo.
9. Incube durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
10. Detenga la reacción enzimática añadiendo **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. 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, DEMEDITEC 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 cuadriculado, 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.

6.3.1 Ejemplo de 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)
<i>Zero Standard</i> (0 U/mL)	0,147
<i>Standard 1</i> (31 U/mL)	0,515
<i>Standard 2</i> (62 U/mL)	0,857
<i>Standard 3</i> (125 U/mL)	1,423
<i>Standard 4</i> (250 U/mL)	2,127

7 VALORES DE REFERENCIA

Los valores son solo para orientación del usuario. Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca sus propios valores específicos que tengan en cuenta a la población autóctona de la zona donde se ubica el laboratorio. Los resultados no deben ser el único motivo que justifique la aplicación de una terapia. Los resultados deben estar vinculados con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas.

Un estudio realizado con sujetos aparentemente sanos en el que se usó Demeditec Anti-Spermatozoa Antibody (ASA) serum ELISA reveló lo siguiente:

Valor de corte	60 U/mL
Valores normales	< 55 U/mL
Zona gris	55 U/mL – 70 U/mL
Valores elevados	> 70 U/mL

Si el valor se encuentra en la zona gris (55 U/mL a 70 U/mL), recomendamos repetir la determinación con una nueva muestra tomada en las dos semanas siguientes.

8 CONTROL DE CALIDAD

Unas buenas prácticas de laboratorio requieren el uso de controles en cada curva estándar. Es conveniente analizar una cantidad de controles estadísticamente significativa para poder establecer unos valores de media y unos intervalos aceptables que favorezcan un rendimiento adecuado. Se recomienda usar las muestras de control según las regulaciones estatales y federales. El uso de muestras de control es aconsejable para garantizar la validez de los resultados cada día. Use controles en niveles tanto normales como patológicos. Los controles y los resultados correspondientes del laboratorio de control de calidad figuran en el certificado de análisis (CoA) incluido con el kit. Los valores e intervalos reflejados en un CoA siempre se corresponden con el lote de kit actual, y deben usarse para cotejar los resultados de forma directa. Si los hay, también es recomendable participar en programas de control de calidad nacionales o internacionales para garantizar la precisión de los resultados. Emplee unos métodos estadísticos adecuados para analizar las tendencias y los valores de control. Si los resultados del ensayo no coinciden con los intervalos aceptables establecidos del material de control, los resultados de paciente deben considerarse como no válidos. En tal caso, compruebe las siguientes cuestiones técnicas: Aparatos de pipeteo y temporizadores; fotómetro, fechas de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Si, una vez comprobadas todas estas cuestiones, sigue sin encontrar errores, póngase en contacto su distribuidor o directamente con DEMEDITEC.

9 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

9.1 Especificidad de los anticuerpos (reactividad cruzada)

Hasta la fecha no se tiene conocimiento de ninguna sustancia que tenga efecto en las mediciones de AAE de una muestra.

9.2 Capacidad de detección

Límite de blanco (LoB)	5,440 U/mL
Límite de detección (LoD)	8,553 U/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	12,386 U/mL
Intervalo de medición	8,553 U/mL – 250 U/mL
Intervalo lineal	8,553 U/mL – 250 U/mL

Encontrará información sobre lo siguiente:

9.3 Repetibilidad y reproducibilidad

9.4 Recuperación

9.5 Linealidad

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

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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.

10.1 Sustancias interferentes

10.1.1 Interferencia de la matriz

No se han registrado interferencias (desviación $< \pm 20\%$) para la adición de interferentes hasta la concentración indicada en la siguiente tabla.

Bilirrubina no conjugada	0,5 mg/mL
Hemoglobina	4 mg/mL
Triglicéridos	7,5 mg/mL

Encontrará información sobre lo siguiente:

10.1.2 Interferencia de anticuerpos heterófilos

10.1.3 Interferencia de autoanticuerpos

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

10.1.4 Interferencias de medicamentos

Hasta la fecha no se tiene conocimiento de ninguna sustancia (medicamento) que pueda influir en los resultados de este ensayo.

10.2 Efecto gancho en concentraciones elevadas

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

11 CUESTIONES LEGALES

11.1 Fiabilidad de los resultados

La prueba se debe realizar siguiendo exactamente las instrucciones de uso del fabricante. Es más, el usuario debe cumplir estrictamente las reglas de buenas prácticas de laboratorio o cualquier norma o legislación nacional en vigor. Esto es especialmente relevante al usar reactivos de control. Es importante incluir siempre en el procedimiento de la prueba una cantidad suficiente de controles que validen la precisión de la prueba.

Los resultados de la prueba serán válidos únicamente si todos los controles están dentro de los intervalos especificados y si todos los demás parámetros de la prueba están dentro también de las

especificaciones del ensayo pertinentes. Si existe alguna duda o reparo en relación con un resultado, póngase en contacto con DEMEDITEC.

11.2 Aplicación de terapias

La aplicación de una terapia no debe estar justificada únicamente por los resultados de laboratorio, aun cuando todos los resultados de la prueba coincidan con lo establecido en el punto 11.1. Un resultado de laboratorio es solo una parte del cuadro clínico total de un paciente. La aplicación de una terapia solo estará justificada en aquellos casos en los que los resultados de laboratorio coincidan con el cuadro clínico general del paciente. El resultado de la prueba en sí no debe tomarse como único factor determinante de la aplicación de una terapia.

11.3 Responsabilidad

Cualquier alteración del kit de prueba y/o intercambio o mezcla de componentes de lotes distintos entre un kit de prueba y otro podría afectar negativamente a los resultados previstos y a la validez de la prueba en general. Tal alteración o intercambio invalidará cualquier reclamación de sustitución. Tampoco serán válidas las reclamaciones enviadas con motivo de una mala interpretación por parte del cliente de los resultados de laboratorio según el punto 11.2. Con independencia de todo esto, en caso de reclamación, la responsabilidad del fabricante no superará el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al kit de prueba durante su transporte quedará fuera de la responsabilidad del fabricante.











11.4 Información de incidentes graves

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

12 LITERATURE

1. Lahteenmaki A et a.: 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 W et 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. Ghazal et al. Ann Lab Med. (2022) 42(1). 3-23

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	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	utilisation 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 advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	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