

## Návod k použití sady sloužící ke stanovení pokrytí spermií protilátkami IgG

### (Smíšená antiglobulinová reakce)

[Název výrobku]

Obecný název: Sada určená ke stanovení pokrytí spermií protilátkami IgG (smíšená antiglobulinová reakce)

Obchodní název: SpermFunc® MAR IgG

[Specifikace balení ] 40 testů v sadě

[Účel použití]

Souprava se používá pro screening na imunologickou neplodnost.

Protilátky vyskytující se na povrchu spermií mohou snížit pohyblivost spermií, blokovat jejich průchod přes cervikální hlen, a také inhibovat vazbu spermie-oocyt, a tím způsobit, že nedojde k oplodnění. Pokrytí spermií protilátkami je považováno za typický a specifický ukazatel imunologické neplodnosti. Pokud je výsledek MAR testu abnormální, jedná se pravděpodobně o imunologickou neplodnost. Avšak tato diagnóza musí být potvrzena pomocí jiných testů (kontaktní test spermií a cervikálního hlenu, test spermií a cervikálního hlenu v kapilární trubičce).

[Princip testu]

Smíšená aglutinační reakce (MAR). Antisérum anti-IgG se může spojit s protilátkami IgG na povrchu spermie, a také s IgG, které se nachází na latexových částicích, a tím dojde k vytvoření komplexu protilátek IgG na spermatu, anti-IgG a IgG na latexových částicích, přičemž latexové částice přichycené na povrchu spermie se pohybují spolu se spermií. Pohyblivé spermie, pokud jsou pozorovány s přichycenými latexovými částicemi, představují přítomnost pokrytí spermií IgG.

[Složení]

Latexové částice potažené IgG	1 ampule	0.25ml
Antiserum lidských protilátek IgG	1 ampule	0.25ml
Látka pro kontrolu kvality MAR IgG	1 ampule	0.25ml

Složení činidla: protilátky proti lidskému IgG, lidský imunoglobulín IgG, latexové částice, fyziologický roztok pufovaný fosfáty.

[Skladovací podmínky a doba použitelnosti]

1 Skladovací podmínky

Sada musí být chráněna před slunečním zářením a skladována při teplotě 2 až 8° C.

2. Doba použitelnosti: Sada musí být skladována při teplotě 2 až 8° C a může být použita během 18 měsíců. Po otevření může být sada uchovávána po dobu 58 dnů při teplotě 2 až 8° C

[Vhodná zařízení]

1. Zařízení, která se mají používat s touto sadou: běžný optický mikroskop nebo fázový kontrastní mikroskop
2. Další zařízení používaná během procesu:
  - 1) lednice o teplotě 2 až 8° C
  - 2) mrazicí box o teplotě -20° C
  - 3) vodní lázeň o konstantní teplotě 37° C
  - 4) vodní lázeň o konstantní teplotě 56° C
  - 5) Centrifuga
3. Ostatní potřebné materiály, které nejsou součástí balení
  - 1) Zařízení na odběr spermatu
  - 2) 1μl až 10μl nastavitelná pipeta s jednorázovou špičkou
  - 3) Podložní sklíčko
  - 4) Krycí sklíčko
  - 5) Jednorázové rukavice
  - 6) Medium pro přípravu spermií
  - 7) Zkapalňovač spermatu

[Požadavky na vzorek]

1. Daní jedinci jsou povinni pohlavně abstinovat po dobu 2 až 7 dní, vzorek spermatu může být získán pomocí masturbace nebo použitím sběrného kondomu při pohlavním styku.
2. Vzorek čerstvého spermatu musí být zcela zkapalněn a následně testován.
3. Z krve po koagulaci extrahujte krevní sérum pomocí centrifugy nebo uložte krev do mrazáku pro pozdější testování.

[Testovací metody]

#### 1. Příprava vzorků

- 1) Čerstvý vzorek spermatu musí být zkapalněn. V případě potřeby může být použito, zkapalňovací činidlo (volitelné), aby se podpořilo celkové zkapalnění.
- 2) Krevní sérum (pro nepřímou metodu MAR) může být uloženo po dobu sedmi dnů při teplotě 2 až 8° C; kryokonzervace o teplotě -20° C je nutná, pokud ukládáme na více než 7 dní, nezmrazujte opakovaně.
- 3) Viskózní cervikální hlen (pro nepřímou metodu MAR), musí být smíchán se 100 U/ml izovolumického bromelainu nebo komerčního zkapalňovacího činidla, a inkubován při 37° C po dobu 10 minut; jakmile je cervikální hlen zcela zkapalněn, odstředte 2000g centrifugou po dobu 10 minut a ihned použijte živné médium k testování nebo kryopreservujte při teplotě -20 ° C. Opakované zmrazování a rozmrazování je zakázáno.

#### 2. Příprava činidel

- 1) Vyjměte činidlo z mrazáku a nechte je stát při pokojové teplotě;
- 2) Jemně protřepejte ampulí naplněnou latexovými částicemi a přitom zabraňte vytváření bublin.

#### 3. Postup

##### A. Přímý test MAR

- 1) Naneste čerstvý zkapalněný ejakulát 5μl na podložné sklíčko;
- 2) Přidejte k němu 5μl latexových částic a míchejte za použití sacího hrotu;
- 3) Přidejte 5μl antiséra lidských protilátek IgG do směsi sperma a latexových částic, a

- jemně zamíchejte za použití sacího hrotu;
- 4) Přiložte krycí sklíčko a inkubujte při pokojové teplotě (25 až 35° C).
  - 5) Sledujte výsledek pomocí fázového kontrastního nebo optického mikroskopu při 400x zvětšení a jasném osvětlení po 3 minutách, a poté opět po 10 minutách.
  - 6) Spočítá se nejméně 200 pohyblivých spermií a je zaznamenán počet spermií s přichycenými latexovými částicemi (pohyblivé spermie, které mají latexové částice přichycené pouze na bičíku, nejsou brány v potaz). Pak se vypočítá procento pohyblivých spermií s přichycenými latexovými částicemi (výsledek testu MAR na IgG).

Například při pozorování 300 pohyblivých spermií, kdy na 120 z nich jsou navázány latexové částice, je  $MAR\ IgA = 100\% \times 120/300 = 40\%$ .

**Poznámka:** Pokud se na všechny pohyblivé spermie připojí latexové částice v průběhu 3 minut od počátku reakce, pak není nutné provádět pozorování po 10 minutách; v případě, kdy počet pohyblivých spermií s připojenými latexovými částicemi není 100%, je nutné provést další čtení po 10 minutách; pokud spermie již neplavou po 10-ti minutách od počátku reakce, je za konečný výsledek testu považováno pozorování po 3 minutách reakce.

## B. Nepřímý test MAR

- 1) Spermie dobrovolníků musí být připraveny pomocí následujících metod:
  - a. Přidejte 1 ml zkapalněného spermatu do zkumavky a opatrně přidejte 2 ml proplachovacího média pro přípravu spermií (jako jsou HTF, BWW a Earle). Nemíchejte rozhraní kapalných vrstev
  - b. Zkumavka je skloněna v úhlu 45 stupňů a inkubována při 37° C po dobu jedné hodiny; pohyblivá spermata pak vplavou do proplachovacího média.
  - c. Nasajte 1.0 až 1.5ml z horní vrstvy kultivačního média, která obsahuje mobilní spermie.
  - d. Přeneste nasátý roztok horní vrstvy do jiné zkumavky a upravte koncentraci spermií na  $20 \times 10^6/\text{ml}$  pomocí média pro přípravu spermií (Pokud je koncentrace shromážděných pohyblivých spermií relativně nízká, může být koncentrované sperma odstředěno. Metoda: odstředěte suspenzi s vplavenými spermii při 500g po dobu 5 minut, odstraňte živné médium a ponechte vysrážené spermie; koncentrace spermií pak může být měřena přidáním malého množství média).
- 2) Připravte sérum následujícím způsobem:
  - a. Inkubujte sérum při 56°C po dobu 30 minut, aby došlo k inaktivaci komplementu.
  - b. Zřeďte sérum v poměru 1: 5 pomocí média pro přípravu spermií, např. 20μl séra + 80μl média pro přípravu spermií.
- 3) Připravte cervikální hlen následujícím způsobem:
  - a. Inkubujte zcela kapalně cervikální hlen při teplotě 56° C po dobu 30 minut, aby došlo k inaktivaci komplementu.
  - b. Nařeďte cervikální hlen v poměru 1: 5 pomocí média pro přípravu spermií, např. 20μl cervikálního hlenu + 80μl média pro přípravu spermií.
- 4) Vložte 50μl zředěného séra (nebo zředěného cervikálního hlenu, látky pro kontrolu

- kvality MAR IgG) a 50 $\mu$ l suspenze spermií od dobrovolníků do jedné Eppendorfovy zkumavky, jemně promíchejte se a inkubujte při teplotě 37° C po dobu 60 minut
- 5) Naneste 5 $\mu$ l směsi séra (nebo cervikálního hlenu) a spermatu, kterou jste připravili v bodě 4, a 5 $\mu$ l latexových částic potažených IgG na stejné podložní sklíčko, dobře promíchejte sacím hrotem a pak přidejte 5 $\mu$ l antiséra a znovu dobře promíchejte se sacím hrotem.
  - 6) Přiložte krycí sklíčko a inkubujte při pokojové teplotě (25 až 35° C).
  - 7) Sledujte výsledek pomocí fázového kontrastního nebo optického mikroskopu při 400x zvětšení a jasném osvětlení po 3 minutách, a poté opět po 10 minutách.
  - 8) Způsob pozorování a počítání je stejný jako u "Přímého testu MAR".

[Referenční hodnota]

Referenční hodnota doporučená Světovou zdravotnickou organizací činí MAR<50%.

[Interpretace výsledků testů ]

Inaktivace antiséra a latexových částic potažených IgG může přispět ke zkreslení výsledků testu. U spermatu se zvýšenou viskozitou nebo zpomaleným zkapalněním může přímý test vést ke klamnému pozitivnímu výsledku. Proto se musí viskozita spermatu snížit před provedením testu.

[Omezení testovacích metod]

Pokud test MAR přinese neobvyklé výsledky, je nutné provést další test na interakci spermií a cervikálního hlenu (např. kontaktní test spermií a cervikálního hlenu, test spermií a cervikálního hlenu v kapilární trubičce). Imunologická neplodnost je indikována pouze tehdy, když jsou výsledky jak testu MAR, tak i dalšího testu abnormální.

[Index výkonnosti výrobku]

1. Přesnost v sérii: Koeficient odchylek (CV)  $\leq$ 8%
2. Přesnost mezi sériemi: relativní odchylka (R)  $\leq$ 10%

[Bezpečnostní opatření]

1. Obsah sad z různých šarží nemůže být zaměňován. Látka pro kontrolu kvality MAR IgG nemusí být ředěna nebo deaktivována.
2. Pozorování MAR se provádí pouze u pohyblivých spermií. Nepohyblivé spermie s velkým počtem latexových částic se nezahrnují do součtu.
3. Pokud jsou ve vzorku tvořeném z velké části aglutinovanými latexovými částicemi spermie s omezenou pohyblivostí, je pak nutné zjistit, jestli byly pokryty protilátkami s přichycenými latexovými částicemi nebo se jedná o vibrace latexových částic v důsledku malé pohyblivosti.
4. Za normálních okolností latexové částice aglutinují po přidání séra. Pokud u pozorovaných latexových částic nenastane aglutinace, lze předpokládat, že kromě nesprávné obsluhy došlo k selhání činidel.
5. Skladujte činidla při teplotě 2 až 8° C a chraňte před mrazem.
6. Všechny odebrané vzorky musí být považovány za potenciálně infekční. Se vzorky a činidly musí být poté, co byly otestovány, zacházeno jako se zdravotnickým odpadem, aby nedošlo

ke znečištění životního prostředí.

7. Souprava pro stanovení pokrytí spermií protilátkami IgG je typem diagnostického činidla in-vitro a výsledky testů slouží pouze jako klinický posudek. Klinická léčba musí zahrnovat kombinaci symptomů/fyzických příznaků pacienta, jeho anamnézu stejně jako výsledky dalších laboratorních vyšetření a terapeutickou odezvu.

[Reference]

1. Světová zdravotnická organizace. Laboratorní manuál WHO pro zkoumání lidského spermatu a interakce spermií a cervikálního hlenu (4. vydání), WHO Press, 2001.
2. Světová zdravotnická organizace. Laboratorní manuál WHO pro zkoumání a zpracování lidského ejakulátu (5. vydání), WHO Press, 2010.

[Výrobce]



BRED Life Science Technology Inc.

7/F, Unit C, Block 10, Huafeng Science & Technology Park, Tangwei St,  
Fuyong Subdistrict, Bao'an District, Shenzhen, China; Směrovací číslo:  
518103 Tel: +86-755-33929737 Fax: +86-755-33929719

Webové stránky: [www.bredlifesci.com](http://www.bredlifesci.com)


 -]REPI DongBang AcuPrime (EU) Limited

1Forrest Units, Hennock Road East, Exeter, EX2 8RU UK

[Datum schválení a modifikace]

Datum schválení: prosinec 2010; Datum modifikace: nebylo modifikováno

[Význam symbolů]

Symboly	Význam
<b>MII</b>	Výrobce
	Zplnomocněný zástupce v rámci Evropského společenství
	Datum spotřeby
<b>ICONTENTS I</b>	Obsah sady
<b>fIOTI</b>	Kód šarže
	Teplotní omezení
<b>cm</b>	Viz návod k použití
<b>&amp;</b>	Upozornění
<b>I1vol</b>	Diagnostické zdravotnické zařízení <i>In vitro</i> .
<b>VJ</b>	Obsah dostatečný pro <n> testů