

SpermMar Test IgA

Тест на латексных частицах для определения антиспермальных антител класса IgA

Документ №: FP09 I01 R01 E.5

Обновление: 30.08.2018 г.

КОНСЕРВАНТ: АЗИД НАТРИЯ 0,09%

ХРАНИТЬ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ОТ 2 °С ДО 8 °С - НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ.

РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

SpermMar Test IgA представляет собой диагностический набор для определения антиспермальных антител класса IgA в сперме человека. Присутствие антиспермальных антител может препятствовать функционированию сперматозоидов, связыванию с оболочкой и акросомной реакции.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Наличие антиспермальных антител (АСАТ), взаимодействующих с антигеном (антигенами) на сперматозоидах, считается типичным и специфическим для иммунологического бесплодия (1, 3, 22, 24). Эти антитела обнаруживаются приблизительно у 8 % бесплодных мужчин (13).

АСАТ принадлежат к различным иммунологическим классам, но только АСАТ класса IgA и IgG являются клинически значимыми (18). АСАТ класса IgG проявляют цитотоксические эффекты, и в достаточной степени обнаруживаются на сперматозоидах или в сыворотке крови с помощью теста SpermMar Test IgG. АСАТ, будучи связанными с компонентом С3 класса IgA, в основном проявляющие свойства агглютинации (14), редко присутствуют без антител класса IgG (6), но их значение для мужского бесплодия может быть более важным. Действительно, пациенты, у которых присутствуют АСАТ класса IgA и IgG, или только антитела класса IgA, имеют очень маленький шанс зачатия естественным способом (6, 20). Таким образом, определение АСАТ класса IgA имеет важнейшее значение как для диагноза, так и для прогноза (21).

Основная часть АСАТ класса IgA вырабатываются придаточными половыми железами (23). Они присутствуют на сперматозоидах и иногда в семенной плазме, но обычно отсутствуют в сыворотке крови. Вследствие этого исследование антиспермальных антител класса IgA в сыворотке крови не рекомендуется (18). Возможно рассматривать вопрос о поиске АСАТ класса IgA в семенной плазме в случаях низкой концентрации или низкой подвижности сперматозоидов, однако потенциальное клиническое значение этих антител является спорным.

Прямой тест SpermMar Test IgA предназначен для обнаружения покрывающих сперматозоиды антител; тест проводится либо со свежими сперматозоидами, либо со сперматозоидами, отделёнными от семенной плазмы одним циклом суспендирования, центрифугирования и ресуспендирования в питательной среде. Эти сперматозоиды смешивают с латексными частицами, покрытыми анти-человеческими анти-IgA. Образование смешанных агглютинатов подвижных сперматозоидов с латексными частицами указывает на наличие антиспермальных антител класса IgA на сперматозоидах (1, 5, 9, 10, 17).

КАТАЛОЖНЫЕ НОМЕРА ПРОДУКТА

SPMA_S SpermMar Test IgA single kit – 50 тестов

SPMA_C SpermMar Test IgA complete kit – 50 тестов

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- 1 флакон, содержащий 0,7 мл латексных частиц SpermMar Test IgA
- Предметные стекла для микроскопа 76 x 26 мм*
- Покровные стекла 24 x 40 мм*
- Микрокапиллярные пипетки, калиброванные на 10 мкл*
- Резиновая груша*

* только в составе набора complete kit

Сертификат анализа и паспорт безопасности на набор доступны по запросу.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Световой микроскоп (с увеличением от 400х до 600х, светлопольный, темнопольный или фазо-контрастный)
- Неспермицидный презерватив

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



Рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачайте по ссылке на нашем сайте или отсканируйте штрих-код).

Сбор образца и подготовка

Сбор спермы производится предпочтительно мастурбацией. При наличии обстоятельств, препятствующих сбору с помощью мастурбации, используются специальные пластиковые презервативы для сбора спермы. Запрещается использовать обычные презервативы для сбора спермы, поскольку они влияют на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов. В идеале сперма должна быть проанализирована в течение 1 часа после эякуляции.

Подготовка реагента

Латексные частицы SpermMar Test IgA Latex Particles готовы к использованию, тем не менее, они должны быть тщательно перемешаны перед использованием для получения гомогенной суспензии.

Прямой тест SpermMar Test IgA для выявления антиспермальных антител класса IgA на сперматозоидах человека

1. Подождите, пока реагенты и образцы не примут комнатную температуру.
2. На покровное стекло поместите:
 - 10 мкл свежей спермы
 - 10 мкл латексных частиц SpermMar Test IgA Latex Particles.

Для этого можно использовать 10-мкл капиллярные пипетки, если они поставляются в наборе.

Памятка: Для использования микрокапиллярной пипетки, вставьте конец пипетки, отмеченный жирной черной отметкой, внутрь в резиновую микрогрушу (приблизительно на 5 мм). Наполните пипетку до первой отметки (10 мкл) с помощью капиллярного эффекта. Не позволяйте жидкость

ПОПАСТЬ В ГРУШУ. ПОМЕСТИТЕ КОНЧИК ПАЛЬЦА НАВЕРХ ГРУШИ. МЕДЛЕННО, СДАВЛИВАЯ ГРУШУ БОЛЬШИМ И УКАЗАТЕЛЬНЫМ ПАЛЬЦАМИ, ВЫДАВИТЕ ЖИДКОСТЬ ИЗ ПИПЕТКИ.

3. Перемешайте образец и латексные частицы 5 раз краем покровного стекла.
4. Накройте смесь покровным стеклом и поместите под световой микроскоп с 400–600-кратным увеличением. Использование фазово-контрастного или темнопольного освещения может облегчить анализ образца.
5. Посчитайте результат через 3 минуты: Сосчитайте 100 подвижных сперматозоидов; из их числа найдите и сосчитайте сперматозоиды, связанные с латексными частицами. После этого рассчитайте процент связанных с латексными частицами сперматозоидов. Посчитайте результат снова через 10 минут.
ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: ХРАНИТЬ ПРЕДМЕТНОЕ СТЕКЛО С ПРЕПАРАТОМ СЛЕДУЕТ ВО ВЛАЖНОЙ СРЕДЕ (НАПР., В ЧАШКЕ ПЕТРИ С УВЛАЖНЕННЫМ КУСОЧКОМ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ).
6. Диагноз иммунологического бесплодия предполагается в том случае, если 10-39 % подвижных сперматозоидов связаны с латексными частицами. Если 40 % и более подвижных сперматозоидов связаны с латексными частицами, то вероятность иммунологического бесплодия весьма высока.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если тест выполнен правильно, отсутствие антиспермальных антител (АСАТ) будет показано свободно двигающимися сперматозоидами, не связанными с латексными частицами. Латексные частицы могут, но обычно не агглютинируют между собой. В присутствии АСАТ сперматозоиды вступают в реакцию с частицами, и одна, а затем несколько латексных частиц соединятся со всеми или с частью подвижных сперматозоидов. Процент подвижных сперматозоидов, показывающий эту смешанную агглютинацию, напрямую связан со степенью тяжести иммунологической реакции.

В основном доля подвижных сперматозоидов, вступивших во взаимодействие с латексными частицами, в тесте SpermMar Test IgA меньше, чем в тесте SpermMar Test IgG, но обратное также иногда наблюдается (12). В редких случаях существует положительная реакция в тесте SpermMar Test IgA при отсутствии какой-либо реакции в тесте SpermMar Test IgG, указывающая на присутствие секреторных антител класса IgA без антител класса IgG. Наличие реакции смешанной агглютинации в 40 % или более в сперме указывает на положительную реакцию в тесте SpermMar Test IgA.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Прямой тест SpermMar Test IgA может проводиться только в случае, если в образце спермы присутствуют подвижные сперматозоиды. Образцы с очень низкой концентрацией или низкой подвижностью спермы могут показать ложноотрицательный результат.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИГОДНОСТИ ТЕСТА

Несколько сотен образцов спермы были исследованы с использованием прямого теста на реакцию смешивания иммуноглобулинов на эритроцитах и прямого теста SpermMar Test IgG. Результаты были идентичны в 97 % случаев. В 3% случаев тест SpermMar выявил антитела, тест на реакцию смешивания иммуноглобулинов на эритроцитах был отрицательным. В этих случаях доля сперматозоидов, проявляющих реакцию в тесте SpermMar, обычно была низкой (14). Точность результатов теста SpermMar Test IgA была доказана после сравнения с иммунофлуоресцентным и нефелометрическим методами.

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

При правильном хранении реагент SpermMar Test IgA стабилен в течение 12 месяцев от даты производства. Реагент SpermMar Test IgA должен храниться при температуре от 2 °C до 8 °C, когда он не используется. **НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ РЕАГЕНТ.** Реагент пригоден к транспортировке или кратковременному хранению при повышенных температурах (до 5 суток при температуре 37 °C).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами всегда используйте защитную одежду и перчатки. SpermMar Test IgA содержит 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, происхождения США.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. BOETTCHER B., HJORT T., RUMKE Ph., SHULMAN S. and VYAZOV O.E. (eds.): Auto and iso-antibodies to antigens of the human reproductive system. 1. Results of an international comparative study of antibodies to spermatozoa and other antigens detected in sera from infertile patients deposited in the WHO Reference bank for reproductive immunology. Acta Pathol Microbiol Scand, 1977, 258 (suppl.) : 1-69
2. COMHAIRE F.H. and KUNNEN M.: Factors affecting the probability of conception after treatment of subfertile men with varicocele by transcatheter embolisation with Bucrylate. Fertil Steril, 1985, 43: 781-786.
3. FRIBERG J.: Immunoglobulin concentration in serum and seminal fluid from men with and without sperm-agglutinating antibodies. Obstet. Gynecol., 1980, 136 : 671-675.
4. GOLOMB J., VARDINON H., HOMONNAI Z.T., BRAF Z. and YUST I.: Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzymelinked Immunosorbent assay (ELISA). Fertil Steril, 1986, 45 : 397-402.
5. JAGER S., KREMER J. and VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T.: A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male. Detection of spermatozoal surface IgG with the direct mixed antiglobulin reaction carried out on untreated fresh human semen. Int. J. Fertil., 1978, 23 : 12-21.
6. JAGER S., KREMER J., KUIKEN J. and VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T.: Immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies from infertile men and inhibition of in vitro sperm penetration into cervical mucus, IntJ. Androl., 1980, 3: 1-14.
7. RUMKE P.: The origin of immunoglobulins in semen. Clin. Exp. Immunol., 1976, 17 : 287-297.
8. SHULMAN J.F. and SHULMAN S.: Methylprednisolone treatment of immunologic infertility in the male. Fertil Steril, 1982, 38 : 591-599.
9. STEDRONSKA J. and HENDRY W.F.: The value of the mixed antiglobulin reaction (MAR-Test) as an addition to routine seminal analysis in the evaluation of the subfertile couple. Am. J. Reprod. Immunol., 1983, 3 : 89-91.
10. VERMEULEN L. and COMHAIRE F.H.: Le test <MAR> aux particules de Latex, et le test spermatoxique selon Suominen : simplification et nouveauté dans l'arsenal du diagnostique immunologique. Contraception-Fertilite-Sexualite, 1983, 11 (suppl.) : 381-384.
11. W.H.O. 1984: Workshop on the standardized investigation of the infertile couple, moderator P. Rowe, coordinator M. Darling. Fertil Steril (eds) R.F. HARRISON, J. BONNAR and W. THOMPSON. Publ. M.T.P.-Press Ltd. (Lancaster, Boston, The Hague, Dordrecht), 1984, 427-431.
12. W.H.O.: Laboratory manual for the examination and processing of human semen. W.H.O., 5th Edition, 2010.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. Int J Androl, 1987, Suppl 7.
14. KREMER J. and JAGER S.: The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. Hum. Reprod., 1992, 7 : 781-784.
15. KAY D.J. and BOETTCHER B.: Comparison of the SpermMar test with currently accepted procedures for detecting human sperm antibodies. Reprod. Fer. Dev., 1992, 4, 175-181.
16. ACKERMAN S., Mc GUIRE G., FULGHAM D.L. and ALEXANDER N.: An evaluation of a commercially available assay for the detection of antisperm antibodies. Fertil Steril 1988, 49 : 732-734.

17. BRONSON R, COOPER G and ROSENFELD D: Sperm antibodies: their role in infertility. Fertil Steril, 1984, 42: 171-183.
18. CLARKE GN, STOJANOFF A, CAUCHI MN and JOHNSTON WIH: The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1985, 7: 143-147.
19. HINTING A, VERMEULEN L and COMHAIRE F: The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially available kit for the detection of antisperm antibodies in serum. Fertil Steril, 1988, 49 :1039-1044.
20. MEINERTZ H and HJORT T: Detection of autoimmunity to sperm: mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. Fertil Steril, 1986, 46 : 86-91.
21. PARSLOW JM, POULTON TA, BESSER GM and HENDRY WF: The clinical relevance of classes of immunoglobulins on spermatozoa from infertile and vasectomized males. Fertil Steril, 1985, 43 : 621.
22. RUMKE P and HELLINGA: Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. Am J Clin Pathol, 1959, 32 : 357-363.
23. UELING DT: Secretory IgA in seminal fluid. Fertil Steril, 1971, 22 : 769-773.
24. WILSON L: Sperm agglutinins in human semen and blood. Proc Soc Exp Biol Med, 1954, 85 : 652-655.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:



FertiPro N.V.

Industriepark Noord 328730 Беернем – Бельгия

Тел. +32 (0)50 79 18 05

Факс +32 (0)50 79 17 99

Веб-сайт: www.fertipro.com

Электронная почта: info@fertipro.com



SpermMar Test IgG

Тест на латексных частицах для определения антиспермальных антител класса IgG

Документ №: FP09 I01 R01 E.5

Обновление: 30.08.2018 г.

КОНСЕРВАНТ: АЗИД НАТРИЯ 0,09%

ХРАНИТЬ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ОТ 2 °С ДО 8 °С - НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ.

РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

SpermMar Test IgG представляет собой диагностический набор для определения антиспермальных антител класса IgG в сперме человека или сыворотке. Прямой тест SpermMar Test IgG можно проводить на необработанной сперме человека, при условии, что она содержит подвижные сперматозоиды. Непрямой тест SpermMar Test IgG можно проводить на сыворотке.

Присутствие антиспермальных антител может препятствовать функционированию сперматозоидов, связыванию с оболочкой и акросомной реакции.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Наличие антиспермальных антител (АСАТ), взаимодействующих с антигенами на сперматозоидах, считается типичным и специфическим для иммунологического бесплодия (2, 4, 11). Эти антитела обнаруживаются приблизительно у 8 % бесплодных мужчин (13).

АСАТ принадлежат к двум иммунологическим классам: IgA и IgG. Имеются некоторые данные, указывающие на то, что антитела класса IgA имеют большее клиническое значение, чем антитела класса IgG. Однако антитела класса IgA редко присутствуют без антител класса IgG. Таким образом, тестирование на антитела класса IgG является достаточным для рутинного скрининга (6, 7, 14).

Прямой тест SpermMar Test IgG проводится путем смешивания свежей необработанной спермы с латексными частицами, покрытыми человеческим IgG. К этой смеси добавляется моноспецифичная антисыворотка к IgG человека. Образование агглютинатов подвижных сперматозоидов с латексными частицами указывает на наличие антиспермальных антител класса IgG на сперматозоидах (1, 5, 9, 10). В непрямом тесте SpermMar Test IgG отмытые подвижные сперматозоиды донора инкубируют с разведенной сывороткой с извлеченным компонентом пациента мужского или женского пола.

Если сыворотка содержит АСАТ, то они покроют сперматозоиды донора, которые проявят положительную реакцию в последующем тесте SpermMar Test IgG.

КАТАЛОЖНЫЕ НОМЕРА ПРОДУКТА

SPMG_S SpermMar Test IgG single kit – 50 тестов

SPMG_C SpermMar Test IgG complete kit – 50 тестов

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- 1 флакон, содержащий 0,7 мл латексных частиц SpermMar Test IgG Latex Particles
- 1 флакон, содержащий 0,7 мл антисыворотки SpermMar Test IgG Antiserum

- Предметные стекла для микроскопа 76 x 26 мм*
 - Покровные стекла 24 x 40 мм*
 - Микрокапиллярные пипетки, калиброванные на 10 мкл*
 - Резиновая груша*
- * только в составе набора complete kit

Сертификат анализа и паспорт безопасности на набор доступны по запросу.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Световой микроскоп (с увеличением от 400х до 600х, светлопольный, темнопольный или фазово-контрастный)
- среда EBSS без добавления белка – для непрямого теста SpermMar Test IgG (напр., Sigma-Aldrich, кат.№ E2888)
- Неспермицидный презерватив
- Титрационный микропланшет (напр., Kima 650 101)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



Рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачайте по ссылке на нашем сайте или отсканируйте штрих-код).

Сбор образца и подготовка

Сбор спермы производится предпочтительно мастурбацией. При наличии обстоятельств, препятствующих сбору с помощью мастурбации, используются специальные пластиковые презервативы для сбора спермы. Запрещается использовать обычные презервативы для сбора спермы, поскольку они могут влиять на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов. В идеале сперма должна быть проанализирована в течение 1 часа после эякуляции.

Подготовка реагента

Латексные частицы SpermMar Test IgG Latex Particles готовы к использованию, тем не менее, они должны быть тщательно перемешаны перед использованием для получения однородной суспензии. Антисыворотка SpermMar Test IgG Antiserum готова к использованию.

Прямой тест SpermMar Test IgG

1. Подождите, пока реагенты и образцы не примут комнатную температуру.

2. На предметное стекло поместите:

- 10 микролитров свежей необработанной спермы
- 10 микролитров латексных частиц SpermMar Test IgG Latex Particles
- 10 микролитров антисыворотки SpermMar Test IgG Antiserum

Для этого можно использовать 10-мкл капиллярные пипетки, если они поставляются в наборе.

Памятка: Для использования микрокапиллярной пипетки вставьте конец пипетки, отмеченный жирной черной отметкой, внутрь в резиновую микрогрушу (приблизительно на 5 мм). Наполните пипетку до первой отметки (10 мкл) с помощью капиллярного эффекта. Не позволяйте жидкость попасть в грушу. Поместите кончик пальца наверх груши. Медленно, сдавливая грушу большим и указательным пальцами, выдавите жидкость из пипетки.

3. Перемешайте образец и латексные частицы Latex Particles 5 раз краем покровного стекла.
4. Перемешайте антисыворотку Antiserum и смесь латексных частиц с образцом.
5. Накройте смесь покровным стеклом и поместите под световой микроскоп с 400 – 600-кратным увеличением. Использование фазово-контрастного или темнопольного освещения может облегчить анализ образца.

6. Посчитайте результат через 2-3 минуты. Сосчитайте 100 подвижных сперматозоидов; из их числа найдите и сосчитайте сперматозоиды, связанные с латексными частицами. После этого рассчитайте процент связанных с латексными частицами сперматозоидов. Если связывания латексных частиц со сперматозоидами не наблюдается, посчитайте результат снова через 10 минут.

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: ХРАНИТЬ ПРЕДМЕТНОЕ СТЕКЛО С ПРЕПАРАТОМ СЛЕДУЕТ ВО ВЛАЖНОЙ СРЕДЕ (НАПР., В ЧАШКЕ ПЕТРИ С УВЛАЖНЕННЫМ КУСОЧКОМ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ).

Непрямой тест SpermMar Test IgG

1. Подождите, пока реагенты и образцы не примут комнатную температуру.
2. Инактивируйте образцы сыворотки/плазмы путем их нагревания при температуре 56 °C в течение 30 минут (если используются стеклянные пробирки) или 45 минут (если используются пластиковые пробирки).
3. Доведите pH среды EBSS до 7,4-7,5 путем добавления 0,1 N NaOH или HCl.
4. Отмойте подвижные сперматозоиды донора методом всплытия в среде с отрегулированным pH (pH = 7,4-7,5). Отмывка должна проводиться в 5-мл стеклянных или стерильных пластиковых пробирках с круглым дном при температуре 37 °C в течение 45 минут. Доведите концентрацию сперматозоидов до 20×10^6 сперматозоидов/мл с помощью среды EBSS (pH = 7,4-7,5).
5. Последовательно разведите в титровальном планшете инактивированную сыворотку/плазму до 1/16 с помощью среды EBSS (pH = 7,4-7,5).
6. Смешайте 50 мкл разведенной (1/16) инактивированной сыворотки/плазмы (п.5) и 50 мкл отмытых подвижных сперматозоидов донора (п.4) в пустой лунке титровального планшета. Инкубируйте при температуре 37 °C в течение 60 минут.
7. На предметное стекло поместите:
 - 10 микролитров смеси сперматозоидов и сыворотки/плазмы
 - 10 микролитров латексных частиц SpermMar Test IgG Latex Particles
 - 10 микролитров антисыворотки SpermMar Test IgG Antiserum
8. Перемешайте образец и латексные частицы 5 раз краем покровного стекла.
9. Перемешайте антисыворотку и смесь латексных частиц с образцом.
10. Накройте смесь покровным стеклом и поместите под световой микроскоп с 400 – 600-кратным увеличением. Использование фазово-контрастного или темнопольного освещения может облегчить анализ образца.

11. Посчитайте результат через 2-3 минуты: Сосчитайте 100 подвижных сперматозоидов; из их числа найдите и сосчитайте сперматозоиды, связанные с латексными частицами. После этого рассчитайте процент связанных с латексными частицами сперматозоидов. Если связывания латексных частиц со сперматозоидами не наблюдается, посчитайте результат снова через 10 минут.

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: ХРАНИТЬ ПРЕДМЕТНОЕ СТЕКЛО С ПРЕПАРАТОМ СЛЕДУЕТ ВО ВЛАЖНОЙ СРЕДЕ (НАПР., В ЧАШКЕ ПЕТРИ С УВЛАЖНЕННЫМ КУСОЧКОМ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ). ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИСПАРЕНИЯ ВО ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ ВСЕГДА ЗАКРЫВАЙТЕ ПРЕПАРАТ ПЛЕНКОЙ (ПАРАФИЛЬМ).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если тест выполнен правильно, отсутствие антиспермальных антител (АСАТ) будет показано свободно двигающимися сперматозоидами, не связанными с латексными частицами. Сами латексные частицы будут формировать растущие агглютинаты между собой, что подтверждает реакционную способность реагентов. При наличии АСАТ сперматозоиды будут частично покрываться латексными частицами. В некоторых случаях сперматозоиды могут даже быть обездвижены большим количеством связанных с ними латексных частиц. В прямом тесте SpermMar Test IgG диагноз иммунологического бесплодия подозревается, когда 10-39 % подвижных сперматозоидов покрыты латексными частицами. Если латексными частицами покрыто ≥ 40 % сперматозоидов, то иммунологическое бесплодие весьма вероятно. Дополнительные исследования должны подтвердить данный диагноз. Во всех случаях получения положительного результата теста рекомендуется провести исследование на наличие АСАТ класса IgA с помощью теста SpermMar Test IgA.

В непрямом тесте SpermMar Test IgG присутствие реакции между покрытыми латексными частицами и подвижными сперматозоидами у ≥ 40 % сперматозоидов принимается в качестве нижнего пограничного значения существенной активности.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Прямой тест SpermMar Test IgG может проводиться только в случае, если в образце спермы присутствуют подвижные сперматозоиды. Образцы с низкой подвижностью могут показать ложноотрицательный результат. В этих случаях рекомендуется проведение непрямого теста SpermMar Test IgG.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИГОДНОСТИ ТЕСТА

Прямой тест SpermMar Test IgG

Несколько сотен образцов спермы были исследованы с использованием прямого теста на реакцию смешивания иммуноглобулинов на эритроцитах и теста SpermMar Test IgG. Результаты были идентичны в 97 % случаев. В 3% случаев тест SpermMar IgG выявил антитела (хотя и в относительно небольших количествах, $<40\%$), тогда как тест на реакцию смешивания иммуноглобулинов на эритроцитах был отрицательным, что доказывает более высокую чувствительность теста SpermMar Test IgG (10, 16).

Непрямой тест SpermMar Test IgG

Используя значение 40 % реакции между подвижными сперматозоидами и латексными частицами в качестве нижнего пограничного значения существенной активности, в некоторых случаях непрямой тест SpermMar Test IgG показал положительный результат, в то время как результаты теста на реакцию агглютинации в лунках были отрицательными. Было доказано, что тест SpermMar Test IgG более прост в использовании и более чувствителен (15). Ложноотрицательный результат непрямого теста SpermMar Test IgG в сравнении с тестом на реакцию агглютинации в лунках наблюдался в случаях наличия IgM в сыворотке, клиническое значение которого вызывает сомнения. Рекомендуется подтвердить положительный результат непрямого теста SpermMar Test IgG

дополнительными тестами на определение активности агглютинации (тест на реакцию агглютинации в лунках) и цитотоксической активности (цитотоксический тест на высвобождение АТФ). Эти тесты также определяют тип иммунологического эффекта, вызываемого антиспермальными антителами.

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Реагенты набора SpermMar Test IgG стабильны в течение 18 месяцев от даты производства. Реагенты SpermMar Test IgG должны храниться при температуре от 2 °С до 8 °С, когда они не используются. **НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.** Реагенты пригодны к транспортировке или кратковременному хранению при повышенных температурах (до 5 суток при температуре 37 °С).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все человеческие и органические материалы должны рассматриваться в качестве потенциально опасных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами всегда используйте защитную одежду и перчатки.

Суспензия латексных частиц SpermMar Test IgG содержит 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, происхождения из США.

Латексные частицы SpermMar Test IgG покрыты человеческим IgG, все используемые материалы показали отрицательный результат при тестировании производителем на гепатит В и С и ВИЧ.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. BOETTCHER B., HJORT T., RUMKE Ph., SHULMAN S. and VYAZOV O.E. (eds.): Auto and iso-antibodies to antigens of the human reproductive system. 1. Results of an international comparative study of antibodies to spermatozoa and other antigens detected in sera from infertile patients deposited in the WHO Reference bank for reproductive immunology. Acta Pathol Microbiol Scand, 1977, 258 (suppl.) : 1-69
2. COMHAIRE F.H. and KUNNEN M.: Factors affecting the probability of conception after treatment of subfertile men with varicocele by transcatheter embolisation with Bucrylate. Fertil Steril, 1985, 43: 781-786.
3. FRIBERG J.: Immunoglobulin concentration in serum and seminal fluid from men with and without sperm-agglutinating antibodies. Obstet. Gynecol., 1980, 136 : 671-675.
4. GOLOMB J., VARDINON H., HOMONNAI Z.T., BRAF Z. and YUST I.: Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzymelinked Immunosorbent assay (ELISA). Fertil Steril, 1986, 45 : 397-402.
5. JAGER S., KREMER J. and VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T.: A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male. Detection of spermatozoal surface IgG with the direct mixed antiglobulin reaction carried out on untreated fresh human semen. Int. J. Fertil., 1978, 23 : 12-21.
6. JAGER S., KREMER J., KUIKEN J. and VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T.: Immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies from infertile men and inhibition of in vitro sperm penetration into cervical mucus, IntJ. Androl., 1980, 3: 1-14.
7. RUMKE P.: The origin of immunoglobulins in semen. Clin. Exp. Immunol., 1976, 17 : 287-297.
8. SHULMAN J.F. and SHULMAN S.: Methylprednisolone treatment of immunologic infertility in the male. Fertil Steril, 1982, 38 : 591-599.
9. STEDRONSKA J. and HENDRY W.F.: The value of the mixed antiglobulin reaction (MAR-Test) as an addition to routine seminal analysis in the evaluation of the subfertile couple. Am. J. Reprod. Immunol., 1983, 3 : 89-91.
10. VERMEULEN L. and COMHAIRE F.H.: Le test <MAR> aux particules de Latex, et le test spermatoxique selon Suominen : simplification et nouveauté dans l'arsenal du diagnostique immunologique. Contraception-Fertilite-Sexualite, 1983, 11 (suppl.) : 381-384.

11. W.H.O. 1984: Workshop on the standardized investigation of the infertile couple, moderator P. Rowe, coordinator M. Darling. Fertil Steril (eds) R.F. HARRISON, J. BONNAR and W. THOMPSON. Publ. M.T.P.-Press Ltd. (Lancaster, Boston, The Hague, Dordrecht), 1984, 427-431.
12. W.H.O.: Laboratory manual for the examination and processing of human semen. W.H.O., 5th Edition, 2010.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. Int J Androl, 1987, Suppl 7.
14. KREMER J. and JAGER S.: The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. Hum. Reprod., 1992, 7 : 781-784.
15. KAY D.J. and BOETTCHER B.: Comparison of the SpermMar test with currently accepted procedures for detecting human sperm antibodies. Reprod. Fer. Dev., 1992, 4, 175-181.
16. ACKERMAN S., Mc GUIRE G., FULGHAM D.L. and ALEXANDER N.: An evaluation of a commercially available assay for the detection of antisperm antibodies. Fertil Steril 1988, 49 : 732-734.
17. BRONSON R, COOPER G and ROSENFELD D: Sperm antibodies: their role in infertility. Fertil Steril, 1984, 42: 171-183.
18. CLARKE GN, STOJANOFF A, CAUCHI MN and JOHNSTON WIH: The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1985, 7: 143-147.
19. HINTING A, VERMEULEN L and COMHAIRE F: The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially available kit for the detection of antisperm antibodies in serum. Fertil Steril, 1988, 49 :1039-1044.
20. MEINERTZ H and HJORT T: Detection of autoimmunity to sperm: mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. Fertil Steril, 1986, 46 : 86-91.
21. PARSLOW JM, POULTON TA, BESSER GM and HENDRY WF: The clinical relevance of classes of immunoglobulins on spermatozoa from infertile and vasectomized males. Fertil Steril, 1985, 43 : 621.
22. RUMKE P and HELLINGA: Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. Am J Clin Pathol, 1959, 32 : 357-363.
23. UELING DT: Secretory IgA in seminal fluid. Fertil Steril, 1971, 22 : 769-773.
24. WILSON L: Sperm agglutinins in human semen and blood. Proc Soc Exp Biol Med, 1954, 85 : 652-655.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:



FertiPro N.V.

Industriepark Noord 328730 Беернем – Бельгия

Тел. +32 (0)50 79 18 05

Факс +32 (0)50 79 17 99

Веб-сайт: www.fertipro.com

Электронная почта: info@fertipro.com



Положительный и отрицательный контроли для набора SpermMar Test IgG

Контроли для использования с непрямым тестом SpermMar Test IgG для определения антиспермальных антител класса IgG

Документ №: FP09 I01 R01 E.5
Обновление: 30.08.2018 г.

КОНСЕРВАНТ: АЗИД НАТРИЯ 0,09%

ХРАНИТЬ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ОТ 2 °С ДО 8 °С. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ!

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ.

РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Положительный (SpermMar Test IgG Positive Control) и отрицательный (SpermMar Test IgG Negative Control) контроли предназначены для использования в виде контролей качества в тесте SpermMar Test IgG.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Наличие антиспермальных антител (АСАТ), взаимодействующих с антигенами на сперматозоидах, считается типичным и специфическим для иммунологического бесплодия (2, 4, 11). АСАТ принадлежат к двум иммунологическим классам: IgA и IgG. Имеются некоторые данные, указывающие на то, что антитела класса IgA имеют большее клиническое значение, чем антитела класса IgG. Однако антитела класса IgA редко присутствуют без антител класса IgG. Таким образом, тестирование на антитела класса IgG является достаточным для рутинного скрининга (6, 7, 14).

В непрямом тесте SpermMar Test IgG отмытые подвижные сперматозоиды донора инкубируют с разведенной сывороткой с извлеченным комплементом пациента мужского или женского пола. Если сыворотка содержит АСАТ, то они покроют сперматозоиды донора, которые проявят положительную реакцию в последующем тесте SpermMar Test IgG.

Положительный контроль SpermMar Test IgG positive control содержит готовую к использованию сыворотку пациента с уровнем антиспермальных антител выше 80 %. Отрицательный контроль SpermMar Test IgG negative control содержит готовую к использованию сыворотку пациента с уровнем антиспермальных антител ниже 40 %.

КАТАЛОЖНЫЕ НОМЕРА ПРОДУКТА И СОДЕРЖАНИЕ НАБОРА

SPMG_P	1 фл. х 2,5 мл положительного контроля (сыворотки) для теста SpermMar Test IgG
SPMG_N	1 фл. х 2,5 мл отрицательного контроля (сыворотки) для теста SpermMar Test IgG

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- 1 флакон, содержащий 2,5 мл сыворотки пациента с извлеченным комплементом, разведенной в среде FertiCult Flushing Medium без сывороточного альбумина человека

Сертификат анализа и паспорт безопасности на набор доступны по запросу.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Тест SpermMar Test IgG
- Световой микроскоп (с увеличением от 400х до 600х, светопольный, темнопольный или фазово-контрастный)
- Предметные стекла
- Покровные стекла
- Среда EBSS (сбалансированный солевой раствор Эрла)
- Титрационный микропланшет

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Подготовка реагента

Положительный (SpermMar Test IgG positive control) и отрицательный (SpermMar Test IgG negative control) контроли готовы к использованию. Перед использованием подождите, пока реагенты не примут комнатную температуру.

Сбор образца и подготовка

Сбор спермы донора производится предпочтительно мастурбацией или другим методом, рекомендованным врачом. В идеале сперма должна быть проанализирована в течение 1 часа после эякуляции.

Процедура

1. Подождите, пока все реагенты и образцы не примут комнатную температуру.
2. Отмойте подвижные сперматозоиды донора методом всплытия в среде EBSS с отрегулированным рН (рН = 7,4-7,5). Отмывка должна проводиться в 5-мл стеклянных или стерильных пластиковых пробирках с круглым дном при температуре 37 °С в течение 45 минут. Доведите концентрацию сперматозоидов до 20×10^6 сперматозоидов/мл с помощью среды EBSS (рН = 7,4-7,5).
3. Смешайте 50 мкл контрольной сыворотки и 50 мкл отмытых подвижных сперматозоидов донора в пустой лунке титровальной планшеты. Инкубируйте при температуре 37 °С в течение 60 минут.
4. На предметное стекло поместите:
 - 10 микролитров смеси сперматозоидов и сыворотки
 - 10 микролитров латексных частиц SpermMar Test IgG Latex Particles
 - 10 микролитров антисыворотки SpermMar Test IgG Antiserum
5. Перемешайте образец и латексные частицы 5 раз краем покровного стекла.
6. Перемешайте антисыворотку и смесь латексных частиц с образцом.
7. Накройте смесь покровным стеклом и поместите под световой микроскоп с 400 - 600-кратным увеличением. Использование фазово-контрастного или темнопольного микроскопа может облегчить анализ образца.
8. Посчитайте результат через 2-3 минуты: Сосчитайте 100 подвижных сперматозоидов; из их числа найдите и сосчитайте сперматозоиды, связанные с латексными частицами. После этого рассчитайте процент связанных с латексными частицами сперматозоидов. Если связывания латексных частиц со сперматозоидами не наблюдается, посчитайте результат снова через 10 минут.

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: ХРАНИТЬ ПРЕДМЕТНОЕ СТЕКЛО С ПРЕПАРАТОМ СЛЕДУЕТ ВО ВЛАЖНОЙ СРЕДЕ (НАПР., В ЧАШКЕ ПЕТРИ С УВЛАЖНЕННЫМ КУСОЧКОМ ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ). Для предотвращения испарения во время инкубации ВСЕГДА ЗАКРЫВАЙТЕ ПРЕПАРАТ ПЛЕНКОЙ (ПАРАФИЛЬМ).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если тест выполнен правильно, отсутствие антиспермальных антител (АСАТ) будет показано свободно двигающимися сперматозоидами, не соединившимися с латексными частицами. Сами латексные частицы будут формировать растущие агглютинаты между собой, что подтверждает реакционную способность реагентов. При наличии АСАТ сперматозоиды будут частично покрываться латексными частицами. В некоторых случаях сперматозоиды могут даже быть обездвижены большим количеством связанных с ними латексных частиц.

- Результаты теста с положительным (SpermMar Test IgG positive control) контролем должны показать 80 % или более подвижных сперматозоидов, покрытых латексными частицами.

- Результаты теста с отрицательным (SpermMar Test IgG negative control) контролем должны показать 40 % или менее подвижных сперматозоидов, покрытых латексными частицами.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Непрямой тест SpermMar Test IgG может проводиться только в случае, если в образце спермы присутствуют подвижные сперматозоиды.

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Контрольная сыворотка (SpermMar IgG positive control и SpermMar IgG negative control) стабильна в течение 18 месяцев от даты производства. Контрольная сыворотка SpermMar IgG должна храниться при температуре 2-8 °С, когда она не используется.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все человеческие и органические материалы должны рассматриваться в качестве потенциально опасных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами всегда используйте защитную одежду и перчатки.

Хотя SpermMar Test IgG positive control и SpermMar Test IgG negative control были протестированы на ВИЧ и гепатит, необходимо всегда использовать защитную одежду при обращении с контрольной сывороткой.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. BOETTCHER B., HJORT T., RUMKE Ph., SHULMAN S. and VYAZOV O.E. (eds.): Auto and iso-antibodies to antigens of the human reproductive system. 1. Results of an international comparative study of antibodies to spermatozoa and other antigens detected in sera from infertile patients deposited in the WHO Reference bank for reproductive immunology. Acta Pathol Microbiol Scand, 1977, 258 (suppl.) : 1-69
2. COMHAIRE F.H. and KUNNEN M.: Factors affecting the probability of conception after treatment of subfertile men with varicocele by transcatheter embolisation with Bucrylate. Fertil Steril, 1985, 43: 781-786.
3. FRIBERG J.: Immunoglobulin concentration in serum and seminal fluid from men with and without sperm-agglutinating antibodies. Obstet. Gynecol., 1980, 136 : 671-675.
4. GOLOMB J., VARDINON H., HOMONNAI Z.T., BRAF Z. and YUST I.: Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzymelinked Immunosorbent assay (ELISA). Fertil Steril, 1986, 45 : 397-402.

5. JAGER S., KREMER J. and VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T.: A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male. Detection of spermatozoal surface IgG with the direct mixed antiglobulin reaction carried out on untreated fresh human semen. *Int. J. Fertil.*, 1978, 23 : 12-21.
6. JAGER S., KREMER J., KUIKEN J. and VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T.: Immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies from infertile men and inhibition of in vitro sperm penetration into cervical mucus, *IntJ. Androl.*, 1980, 3: 1-14.
7. RUMKE P.: The origin of immunoglobulins in semen. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 17 : 287-297.
8. SHULMAN J.F. and SHULMAN S.: Methylprednisolone treatment of immunologic infertility in the male. *Fertil Steril*, 1982, 38 : 591-599.
9. STEDRONSKA J. and HENDRY W.F.: The value of the mixed antiglobulin reaction (MAR-Test) as an addition to routine seminal analysis in the evaluation of the subfertile couple. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1983, 3 : 89-91.
10. VERMEULEN L. and COMHAIRE F.H.: Le test <MAR> aux particules de Latex, et le test spermatoxique selon Suominen : simplification et nouveauté dans l'arsenal du diagnostic immunologique. *Contraception-Fertilite-Sexualite*, 1983, 11 (suppl.) : 381-384.
11. W.H.O. 1984: Workshop on the standardized investigation of the infertile couple, moderator P. Rowe, coordinator M. Darling. *Fertil Steril* (eds) R.F. HARRISON, J. BONNAR and W. THOMPSON. Publ. M.T.P.-Press Ltd. (Lancaster, Boston, The Hague, Dordrecht), 1984, 427-431.
12. W.H.O.: Laboratory manual for the examination and processing of human semen. W.H.O., 5th Edition, 2010.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl*, 1987, Suppl 7.
14. KREMER J. and JAGER S.: The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum. Reprod.*, 1992, 7 : 781-784.
15. KAY D.J. and BOETTCHER B.: Comparison of the SpermMar test with currently accepted procedures for detecting human sperm antibodies. *Reprod. Fer. Dev.*, 1992, 4, 175-181.
16. ACKERMAN S., Mc GUIRE G., FULGHAM D.L. and ALEXANDER N.: An evaluation of a commercially available assay for the detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril* 1988, 49 : 732-734.
17. BRONSON R, COOPER G and ROSENFELD D: Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril*, 1984, 42: 171-183.
18. CLARKE GN, STOJANOFF A, CAUCHI MN and JOHNSTON WIH: The immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies in serum. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1985, 7: 143-147.
19. HINTING A, VERMEULEN L and COMHAIRE F: The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially available kit for the detection of antisperm antibodies in serum. *Fertil Steril*, 1988, 49 :1039-1044.
20. MEINERTZ H and HJORT T: Detection of autoimmunity to sperm: mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. *Fertil Steril*, 1986, 46 : 86-91.
21. PARSLOW JM, POULTON TA, BESSER GM and HENDRY WF: The clinical relevance of classes of immunoglobulins on spermatozoa from infertile and vasectomized males. *Fertil Steril*, 1985, 43 : 621.
22. RUMKE P and HELLINGA: Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. *Am J Clin Pathol*, 1959, 32 : 357-363.
23. UELING DT: Secretory IgA in seminal fluid. *Fertil Steril*, 1971, 22 : 769-773.
24. WILSON L: Sperm agglutinins in human semen and blood. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1954, 85 : 652-655.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:



FertiPro N.V.

Industriepark Noord 328730 Беернем – Бельгия

Тел. +32 (0)50 79 18 05

Факс +32 (0)50 79 17 99

Веб-сайт: www.fertipro.com

Электронная почта: info@fertipro.com



Fructose Test

96 тестов

Фотометрический тест для количественного определения содержания фруктозы в семенной плазме человека

Документ №: FP09 I29 R01 B.12

Обновление: 01.07.2020 г.

СТАНДАРТ ФРУКТОЗЫ СОДЕРЖИТ 0,09% АЗИДА НАТРИЯ

ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. НАБОР ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Содержание фруктозы в сперме отражает секреторную функцию семенных пузырьков.

Тест Fructose Test предназначен для измерения количества фруктозы в сперме или семенной плазме человека.

Тест Fructose Test может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

ПРИНЦИП ТЕСТА

В присутствии HCl и при нагревании происходит реакция фруктозы с индолом, в результате которой образуется окрашенный комплекс, поглощающий на длинах волн 450-492 нм.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Реагент 1 – 50 мл раствора TCA
- Реагент 2 – 25 мл концентрированной HCl, 32 %
- Реагент 3 – 3 мл индола в метаноле
- Реагент 4 – 25 мл раствора NaOH (0,5 M)
- Стандарт фруктозы – 10 мл (5 мг/мл)

Сертификат анализа и паспорт безопасности (MSDS) доступны по запросу или могут быть загружены с веб-сайта www.fertipro.com.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Планшетный или кюветный фотометр (фильтр 450-492 нм)
- Дозаторы, наконечники
- Центрифужные пробирки
- Титровальный планшет
- Центрифуга (>1000 g)
- Маленькие пробирки для реагентов или пробирки Эппендорфа
- водяная баня или твердотельный нагреватель

ВЫБОР ОБРАЗЦА ДЛЯ АНАЛИЗА

Тест рекомендуется проводить на семенной плазме (в т.ч. замороженной/размороженной), но не в цельной сперме, особенно в случаях, когда незамедлительный анализ образца (в течение 3 часов после сбора образца) невозможен. Это рекомендовано во избежание метаболизирования фруктозы сперматозоидами, что может привести к заниженному результату определения концентрации фруктозы. Заморозьте семенную плазму, если она не может быть проанализирована в день сбора образца.

МЕТОД



Мы рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео перед первым запуском теста. Для этого скачайте видео по ссылке на нашем сайте или отсканируйте штрих-код:

1. Выдержать образец спермы при комнатной температуре до его сжижения.
 2. Измерить общий объем спермы (семенной плазмы) (напр., стерильным шприцем).
 3. Перенести 100 мкл семенной жидкости/семенной плазмы в пробирку.
 4. Дозатором добавить по 100 мкл стандартных растворов фруктозы (см. ниже процедуру их приготовления) в отдельные пробирки и проводить те же манипуляции, что и с образцом семенной жидкости/семенной плазмы.
 5. Добавить по 500 мкл Реагента 1 (раствор ТСА) к образцу и стандартам и перемешать.
 6. Центрифугировать 10 минут при 1000 g или более.
 7. Пипеткой перенести по 20 мкл супернатанта (образца и растворов стандартов), полученного на шаге 6, в чистые пробирки Эппендорфа или маленькие пробирки для реагентов.
 8. Приготовление контрольного образца (бланка, пустой пробы): добавить 20 мкл дистиллированной воды в пустую пробирку Эппендорфа или маленькую пробирку для реагентов.
 9. Добавить по 200 мкл Реагента 2 (HCl) в каждую из пробирок.
- Примечание:** проводите приведенные ниже шаги 10-13 в вытяжном шкафу, поскольку Реагент 3 токсичен при вдыхании (см. раздел *Предупреждение и предостережение*).
10. Добавить по 20 мкл Реагента 3 (индола) в каждую из пробирок.
 11. Закрыть или запечатать пробирки и инкубировать 30 мин при 37 °C в водяной бане или в подходящем твердотельном нагревателе (рекомендуется), или 60 мин при 37 °C в суховоздушном инкубаторе.
 12. Добавить 200 мкл Реагента 4 (NaOH) для прекращения реакции окрашивания.
 13. Пипеткой перенести по 200 мкл образца/стандартов в лунки планшета и измерить оптическую плотность на планшетном фотометре при длине волны 450-492 нм.

Приготовление стандартных растворов фруктозы

В набор входит раствор фруктозы с концентрацией 5 мг/мл.

Приготовьте стандартные растворы со следующими концентрациями фруктозы для построения стандартной кривой:

Стандартные растворы	Раствор фруктозы, поставляемый в наборе	Вода
5 мг/мл	100 мкл	0
2,5 мг/мл	50 мкл	50 мкл
1 мг/мл	20 мкл	80 мкл

Примечание: Для приготовления растворов используйте очищенную (дистиллированную) воду.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматизированного расчета результатов рекомендуется использовать таблицу Excel, которую можно скачать с сайта FertiPro:

<http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=fructo>

Измеренное в образце значение оптической плотности (ОП) сопоставляется со стандартной кривой (для ее построения используются 3 концентрации стандартных растворов, описанные выше): значения ОП откладываются по оси Y, а концентрация фруктозы – по оси X. Для того, чтобы получить значение общего содержания фруктозы, умножьте полученный результат на общий объем образца спермы или семенной плазмы.

Нормальные значения в соответствии с руководством ВОЗ составляют:

- 2,4 мг/эякулят или более
- 13 мкмоль/эякулят или более

Примечание: График стандартной кривой линеен до 0,5 мг/мл, меньшие количества фруктозы с помощью этого набора не определяются достаточно точно.

Низкие значения содержания фруктозы в сперме характерны для обструкции семявыбрасывающего протока, врожденного двустороннего отсутствия семявыводящих протоков, частичной ретроградной эякуляции и андрогенного дефицита (ВОЗ, 2010).

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Коэффициент вариации в пределах одного анализа: 8 % (повторяемость)

Коэффициент вариации для серии анализов: 13 % (суммарная воспроизводимость)

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Набор можно транспортировать или хранить в течение короткого периода при повышенных температурах (до 5 суток при 37 °C).

Хранить реагенты при температуре 2-8 °C в защищенном от света месте. Набор годен к использованию в течение 12 месяцев с даты производства.

Цвет флакона с Реагентом 2 (HCl) может незначительно измениться (до оранжевого или розового, но жидкость остается прозрачной), это не влияет на результаты теста.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Реагент 1 (раствор ТСА): Вызывает сильные ожоги. Очень токсичен для водных организмов, может вызывать долгосрочные неблагоприятные последствия для водной окружающей среды. При попадании в глаза немедленно промыть обильным количеством воды и обратиться к врачу. При любых происшествиях или при недомогании немедленно обратиться к врачу.

Реагент 2 (32% раствор HCl): Вызывает ожоги, оказывает раздражающее действие на дыхательную систему. При попадании в глаза немедленно промыть обильным количеством воды и обратиться к врачу. При любых происшествиях или при недомогании немедленно обратиться к врачу. Никогда не добавляйте воду в концентрированную HCl.

Реагент 3 (индол в метаноле): Токсичен при проглатывании. Избегайте попадания на кожу и в глаза. Легко воспламеним. Токсичен при проглатывании или при вдыхании паров.

Всегда работайте в вытяжном шкафу при использовании данного реагента.

Реагент 4 (NaOH): Вызывает ожоги. При попадании в глаза немедленно промыть обильным количеством воды и обратиться к врачу. При любых происшествиях или при недомогании немедленно обратиться к врачу.

Все человеческие и органические образцы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами и реагентами всегда используйте защитную одежду (перчатки, халат, защитные очки/защитная маска).

РАСЧЕТ УСКОРЕНИЯ (G):

Центрифужное ускорение Вашей центрифуги можно рассчитать с помощью формулы:

$g = 1,118 \times r \times \text{RPM}^2$, или $\text{RPM} = \sqrt{g / (1,118 \times r)}$

где r – радиус центрифуги (ротора) в мм,

RPM – число тысяч оборотов в минуту.

Пример 1:

$r = 100$ мм, RPM = 3 тысячи оборотов в минуту

$g = 1,118 \times 100 \times 9 = 1006$

Пример 1:

$r = 100$ мм, $g = 1200$ g

RPM = квадратный корень из $(1200 / (1,118 \times 100)) = 3.28$

= 3280 оборотов в минуту

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen - 5th Edition. World Health Organization, 2010.



FertiPro N.V., Industriepark Noord 32

8730 Беернем – Бельгия

Электронная почта: info@fertipro.com

Веб-сайт: www.fertipro.com



FRUCTO

Hypo-osmotic swelling test

STERILE A

Тест для диагностики жизнеспособности сперматозоидов (5 x 20 тестов)

Документ №: FP09 I12 R01 A.14

Обновление: 16.06.2020 г.

СРЕДА HOST СТЕРИЛИЗОВАНА С ПОМОЩЬЮ СТЕРИЛИЗУЮЩЕЙ ФИЛЬТРАЦИИ.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. РЕАГЕНТ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Hypo-osmotic swelling test (тест на гипоосмотическое набухание) является полуколичественным тестом, основанным на полупроницаемости неповрежденной (интактной) клеточной мембраны, что вызывает «набухание» сперматозоидов в гипоосмотических условиях, при которых вследствие притока воды в клетку увеличивается клеточный объем (Drevius & Eriksson, 1966). Тест был впервые внедрен Jeyendran et al. (1984).

Тест на гипоосмотическое набухание HOST не должен использоваться в качестве теста для определения функциональности сперматозоидов, но предназначен для применения в качестве опционального, дополнительного теста на жизнеспособность. Тест очень прост, его результаты легко читаются и дают дополнительную информацию о целостности клеточной мембраны хвоста сперматозоида.

Тест на гипоосмотическое набухание HOST может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

Тест HOST не следует использовать для отбора сперматозоидов в процедурах ВРТ, таких как ИКСИ.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

Каталожный номер продукта: HOST (Среда для теста на гипоосмотическое набухание Hypo-osmotic swelling test medium, 5 фл. x 20 мл.)

Сертификат анализа и паспорт безопасности доступны на сайте www.fertipro.com.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- предметные стекла
- покровные стекла
- фазово-контрастный микроскоп
- пипетки

ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

Не используйте продукт, если он стал замутненным или проявляет любые признаки микробиологического загрязнения.

Не используйте продукт, если защитный колпачок флакона снят или поврежден при доставке продукта.

МЕТОД

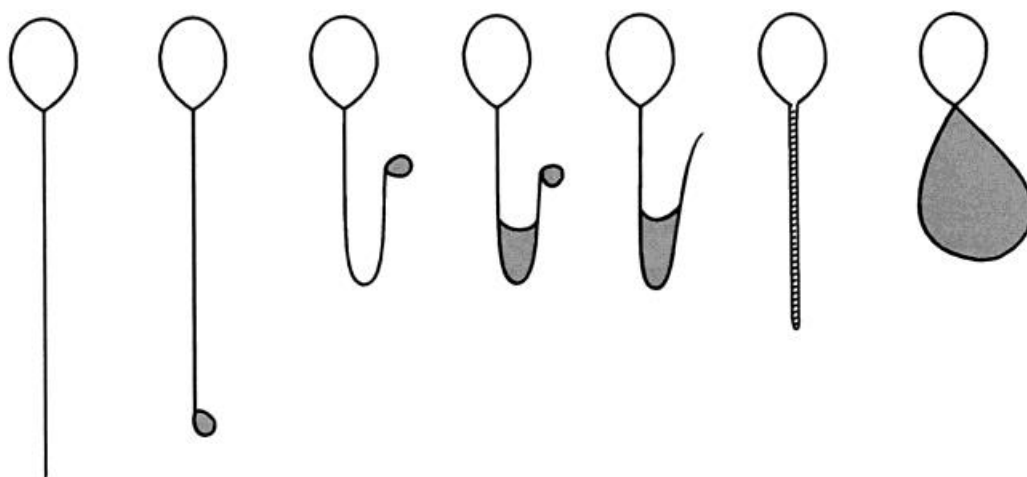


Рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачать по ссылке на нашем сайте или отсканировать штрих-код).

1. Проводить тест рекомендуется в течение 1 часа после сбора образца. Выдержать образец спермы до его сжижения и хранить его при температуре 37 °С. Тест HOST также можно проводить на замороженных / размороженных образцах спермы.

Примечание: в некоторых образцах хвосты сперматозоидов могут быть деформированы до начала проведения теста. В этом случае рекомендуется подсчитать % сперматозоидов с аномалиями хвоста (% с искривленным или набухшим хвостом) до проведения теста.

2. Доведите среду HOST до комнатной температуры и перенесите 1 мл раствора HOST в закрытую пробирку Эппендорфа при 37 ° С примерно на 5 минут. Работайте в гигиенических условиях (свежая игла / наконечник, работа в ламинаре).
3. Добавить 100 мкл сжиженной спермы к 1 мл раствора HOST и осторожно перемешать пипеткой.
4. Выдержать при 37 °С в течение по крайней мере 30 минут (но не дольше 120 минут).
5. Исследовать 200 сперматозоидов под микроскопом при увеличении 200х или 400х (предпочтительно под фазово-контрастным микроскопом). Набухание сперматозоидов определяется как изменения формы хвоста, как показано на рисунке:



Самая левая клетка на рисунке: отсутствие изменений

Остальные клетки на рисунке: различные виды изменений хвоста в результате набухания (Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека 2010)

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Живые клетки дифференцируются по набуханию хвоста сперматозоида; подсчитайте количество сперматозоидов со всеми формами набухания хвоста (рассматриваются в качестве живых сперматозоидов, ВОЗ 2010). Рассчитайте процент сперматозоидов с набухшими или искривленными хвостами после инкубации со средой HOST. Вычтите процент сперматозоидов с деформированными хвостами, наблюдаемый перед тестом.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Информация о том, живые или мертвые неподвижные сперматозоиды, является клинически значимой. Результаты определения жизнеспособности должны оцениваться в сочетании с результатами определения подвижности одного и того же образца спермы. Присутствие значительной части живых, но неподвижных клеток может указывать на структурные дефекты жгутика, а высокий процент неподвижных и мертвых клеток (некрозооспермия) может указывать на патологию придатков яичка.

Образец спермы считается нормальным, если 58 % и более сперматозоидов являются живыми (ВОЗ 2010).

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И СРОК ГОДНОСТИ

Набор можно транспортировать или хранить в течение короткого периода при повышенных температурах (до 5 суток при 37 °С).

Хранить при температуре 2-8 °С. Не содержит антибиотиков. Для извлечения реагента из флакона используйте стерильный шприц. Работайте в строгих гигиенических условиях, желательно при ламинарном потоке.

Стерильность продукта не может быть гарантирована после вскрытия флакона или протыкания резиновой пробки. Использовать в течение 7 дней после вскрытия.

Набор годен к использованию в течение 12 месяцев с даты производства.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все человеческие и органические образцы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами всегда используйте защитную одежду и перчатки.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, WHO, 5th edition, 2010
2. Drevius L., Eriksson H., Osmotic swelling of mammalian spermatozoa, Experimental Cell Research, 1966, 42: 136-56
3. Jeyendran R.S., et al, Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other sperm characteristics, Journal of Reproduction and Fertility, 1984, 70: 219-28.



FertiPro N.V. Industriepark Noord 328730 Беернем – Бельгия
Электронная почта: info@fertipro.com Веб-сайт: www.fertipro.com



Полуколичественный гистохимический набор для определения содержания пероксидаз-положительных лейкоцитов в сперме человека

Документ №: FP09 I111 R01 A.4,

Обновление: 01.02.2021 г.

Только для лабораторной диагностики. Реагенты только для профессионального использования.

ВВЕДЕНИЕ

Лейкоциты (белые клетки крови, БКК) содержатся в эякуляте большинства мужчин, причем преобладающим типом этих клеток являются пероксидаз-положительные гранулоциты^{1,2,3,4}. Присутствие избыточного количества этих клеток (лейкоцитоспермия) может свидетельствовать о присутствии инфекции репродуктивного тракта. Лейкоцитоспермия также может быть ассоциирована с дефектами в профиле спермы (снижением подвижности сперматозоидов и целостности ДНК, повышением вязкости спермы, а также потерей функции спермы в результате окислительного стресса и/или секреции цитотоксических цитокинов этими белыми клетками крови). Хотя лейкоцитоспермия и не является абсолютным показателем бесплодия, данное состояние наблюдается в среднем у 10-20% всех бесплодных мужчин⁸.

При проведении типичного анализа спермы очень трудно дифференцировать белые клетки крови (лейкоциты) от других типов круглых клеток в образце спермы (например, от клеток-предшественников сперматогенеза⁷). Относительно быстрый и недорогой метод дифференцирования пероксидаз-положительных белых клеток крови (лейкоцитов) от других круглых клеток в образце спермы использует внутреннюю пероксидазную активность данных клеток⁷. Тест LeucoScreen Plus, как и LeucoScreen, основан на данном методе, и, таким образом, может быть использован для окрашивания пероксидаз-положительных белых клеток крови в образце спермы человека.

В соответствии с Руководством Всемирной организации здравоохранения, присутствие более 1 млн пероксидаз-положительных белых клеток крови на 1 мл эякулята считается аномальным и обозначается как «лейкоцитоспермия»⁴. Тем не менее, данное пороговое значение в настоящее время обсуждается, поскольку некоторые исследования показали, что данное значение является слишком низким, в то время как другие – слишком высоким. Так, сообщалось⁸⁻¹⁰ о пороговом значении от 0.2×10^6 до 2×10^6 .

В случае, если сперма содержит более 1,0 млн пероксидаз-положительных БКК на 1 мл эякулята, рекомендуется провести дополнительное микробиологическое исследование на наличие инфекции придаточных желез. Оценка маркеров придаточных желез может дать дополнительную полезную информацию о надлежащем функционировании эпидидимиса (набор EpiScreen Plus (определение содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в сперме), FertiPro N.V.), семенных пузырьков (набор Fructose Test (определение содержания фруктозы в сперме), FertiPro N.V.) или простаты. Важно, что отсутствие лейкоцитов в эякуляте не исключает наличие инфекции придаточных желез.

Число тестов, которое может быть проведено с помощью одного набора LeucoScreen Plus, не приводится; вместо этого набор рассчитан на 40 дней проведения анализов в пределах срока годности набора (может быть приготовлено 20 рабочих растворов, которые стабильны на протяжении 2 дней каждый).

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Реагент 1 – 6 мл раствора субстрата (4-CN в метаноле)
- Реагент 2 – 300 мкл 30% перекиси водорода
- Реагент 3 – 22 мл буферного раствора
- Реагент 4 – 1,2 мл раствора для контрастного окрашивания

Сертификат анализа и паспорт безопасности доступны на сайте www.fertipro.com.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Светлопольный микроскоп
- Покровные стекла
- Предметные стекла
- Пробирки
- Пипетки

Примечание: рекомендуется использовать светлопольный микроскоп, и не использовать фазово-контрастный микроскоп, поскольку это может затруднить интерпретацию результатов.

ТИП ОБРАЗЦА ДЛЯ АНАЛИЗА

Тест должен проводиться на свежем образце спермы человека, содержащем более 1 млн/мл круглых клеток. Тест должен проводиться в течение того же дня забора образца.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Миелопероксидаза, содержащаяся в гранулах определенных лейкоцитов, окисляет 4-CN в синевато-пурпурный преципитат 4-хлоро-1-нафтона, используя H_2O_2 в качестве окислителя. Реагент 4 содержит раствор для контрастного окрашивания, облегчающий дифференцирование между пероксидаз-положительными круглыми клетками и пероксидаз-отрицательными круглыми клетками.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- **Пероксидаз-положительные** круглые клетки: содержат (синевато-) черные гранулы и имеют антрацито-серую (*прим.: антрацит = уголь*) цитоплазму. Эта окрашенная в антрацит область может охватывать всю клетку или только ее часть.
- **Пероксидаз-отрицательные** круглые клетки: остаются неокрашенными или окрашены в розовый цвет. Гранулы, видимые в неокрашенных клетках, не окружены типичным антрацитовым цветом, наблюдаемым у положительных клеток.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

В независимом валидационном испытании 44 образца были проанализированы различными операторами с использованием наборов LeucoScreen и LeucoScreen Plus. Характеристики теста:

- **Достоверность:** оба набора обеспечивают сопоставимые результаты (по данным анализа Пассинга-Бэблока)
- **Точность:** оба набора могут различать пероксидаз-положительные и пероксидаз-отрицательные круглые клетки с сопоставимой точностью (LeucoScreen Plus: CV_{intra} : 12%, CV_{inter} : 10%).

ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

Реагент 1 должен содержать прозрачную жидкость: не используйте набор, если жидкость стала желтой.

МЕТОД

До первого использования набора LeucoScreen Plus настоятельно рекомендуется пройти обучение и просмотреть демонстрационное видео (оба доступны на сайте FertiPro N.V.). Видео может быть скачано путем сканирования данного QR-кода:



1. Посчитайте число круглых клеток во время определения концентрации сперматозоидов при рутинном анализе спермы. Посчитайте и запишите общую концентрацию круглых клеток (млн/мл), поскольку она понадобится для расчета концентрации пероксидаз-положительных БКК. В случаях, когда концентрация круглых клеток превышает 1×10^6 /мл, проведите тест с использованием LeucoScreen Plus.
2. Приготовьте рабочий раствор:
Добавьте 200 мкл Реагента 1, 5 мкл Реагента 2 и 1 мл Реагента 3 в пробирку Эппендорфа и тщательно перемешайте. Этот рабочий раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 2-8 °С, с защитой от попадания света.
3. Смешайте 10 мкл спермы с 20 мкл рабочего раствора. Тщательно перемешайте.
4. Инкубируйте **в темноте** 2 мин при комнатной температуре.
5. Перенесите 10 мкл смеси на середину предметного стекла и добавьте 10 мкл Реагента 4. Тщательно перемешайте, используя край покровного стекла.
6. Накройте покровным стеклом.
7. Подсчитайте и классифицируйте 200 круглых клеток, используя 400-кратное увеличение. Проанализируйте различные микроскопные поля (предпочтительно 20 полей).

Примечание: в некоторых случаях (образцах спермы) можно обогатить (увеличить) концентрацию круглых клеток с целью облегчения подсчета клеток. В этом случае центрифугируйте образец 15 мин при 350 g, удалите часть объема жидкости образца спермы и ресуспендируйте осадок.

В случае очень высокой концентрации круглых клеток (напр., выше 20×10^6 на мл) настоятельно рекомендуется разведение образца в ФСБ или среде FertiCult™ Flushing Medium.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРОКСИДАЗ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БЕЛЫХ КЛЕТОК КРОВИ

1. Подсчитайте долю пероксидаз-положительных клеток, как указано ниже:

Доля пероксидаз-положительных клеток =

$$\frac{\text{число пероксидаз - положительных круглых клеток}}{\text{число пероксидаз - положительных круглых клеток} + \text{число пероксидаз - отрицательных круглых клеток}}$$

2. Рассчитайте концентрацию пероксидаз-положительных белых клеток крови в образце спермы, как указано ниже:

Концентрация (млн/мл) =

(Доля пероксидаз-положительных клеток) X (Общая концентрация круглых клеток)

Пример:

- Общая концентрация круглых клеток составляет 2 млн/мл (определена во время рутинного анализа концентрации сперматозоидов)
- Во время проведения теста LeucoScreen Plus было выявлено 120 положительных круглых клеток и 80 отрицательных круглых клеток
- Доля пероксидаз-положительных клеток = $\frac{120}{120 + 80} = 0,6$
- Концентрация пероксидаз-положительных белых клеток крови = $0,6 \times 2 \text{ млн/мл} = 1,2 \text{ млн/мл}$

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Хранить реагенты при температуре 2-25 °С в защищенном от света месте. Набор можно транспортировать или хранить в течение короткого периода при повышенных температурах (до 5 суток при 37 °С). Не замораживать. Беречь от (солнечного) света.

Набор годен к использованию в течение 12 месяцев с даты производства (даже после вскрытия). Не использовать после истечения срока годности, указанного на упаковке. Флаконы должны быть всегда плотно закрыты.

Рабочий раствор может храниться до 48 ч в темноте при температуре 2-8 °С, с защитой от попадания света.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Тест является вспомогательным средством для диагностики мужского бесплодия, и, как и для иных биологических тестов, интерпретация его результатов должна быть проведена в рамках клинических результатов и анамнеза. Тест LeucoScreen Plus окрашивает только пероксидаз-положительные белые клетки крови. Другие типы белых клеток крови (напр., лимфоциты и моноциты) не могут быть определены.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Рекомендуется использовать перчатки. Реагент 1 содержит метанол: избегайте вдыхания паров. Реагент 2 содержит H₂O₂: агрессивное (едкое) вещество, вызывает ожоги. При попадании на кожу немедленно тщательно промыть водой с мылом. Используйте защиту для глаз и лица.

Все образцы спермы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита.

Всегда используйте новые наконечники дозатора для каждого этапа, во избежание кросс-контаминации. Не выбрасывайте набор в окружающую среду.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 49(3): 497-504
2. Aitken, R.J., West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13 (6):433-51.
3. Barratt, C.L.R., Bolton, A.E., Cooke, I.D. (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5(6):639-44.
4. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition (2010), p. 102-107.
5. Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41(1):183-7.
6. Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A., Anderson, D.J. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47(3):460-5.

7. Johannisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. (2000) Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. Human Reproduction Update, 6(4):404-12.
8. Wolff H (1995). The biological significance of white blood cells in semen. Fertil Steril. 63;1143.
9. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. J. Androl: 22: 573-583.
10. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. Andrologica; 35:271-278.



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Беернем – Бельгия
Электронная почта: info@fertipro.com
Веб-сайт: www.fertipro.com



LEUCO_PLUS



Диагностический набор для полуколичественного определения жизнеспособности сперматозоидов человека методом исключения красителя

Документ №: FP09 I14 R01 C.7

Обновление: 07.12.2018 г.

НИГРОЗИН СОДЕРЖИТ 0,05% АЗИДА НАТРИЯ.

РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Жизнеспособность сперматозоидов отражается процентным содержанием «живых» сперматозоидов. Жизнеспособность сперматозоидов следует определять в образцах спермы, содержащих менее 40 % прогрессивно-подвижных сперматозоидов.

В наборе VitalScreen для определения процента живых сперматозоидов используется методика окрашивания эозином-нигрозин.

Методика основывается на том принципе, что мертвые клетки будут поглощать эозин через клеточную мембрану и в результате окрашиваться в красный цвет. Нигрозин обеспечивает темный фон, который облегчает задачу оценки слайдов (образцов).

VitalScreen обеспечивает контроль точности оценки подвижности сперматозоидов, поскольку процент мёртвых сперматозоидов не должен превышать процент неподвижных сперматозоидов.

Набор VitalScreen может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Реагент 1 - 20 мл 1% Эозина Y в солевом растворе
- Реагент 2 - 30 мл 5% Нигрозина в солевом растворе

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Световой микроскоп с увеличением 400-600х
- Предметные стекла
- Покровные стекла
- Микропипетки
- Пробирки (стерильные)

ПОДГОТОВКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

Встряхните флакон с Реагентом 2 (краситель Нигрозин) перед использованием.

МЕТОД



Рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачать по ссылке на нашем сайте или отсканировать штрих-код):

1. Анализ образца рекомендуется проводить в течение 1 часа после сбора образца.

2. Смешайте 50 мкл спермы с 2-мя каплями Реагента 1 в стерильной пробирке. Избегайте контакта флакона реагента с пробиркой, содержащей образец спермы. Аккуратно перемешайте

3. Через 30 секунд добавьте 3 капли Реагента 2 и тщательно перемешайте. Избегайте контакта флакона реагента с пробиркой, содержащей образец спермы.

4. В течение 30 секунд после добавления Реагента 2 поместите 20 мкл полученной смеси спермы и красителей на предметное стекло и незамедлительно накройте покровным стеклом.

5. Незамедлительно проанализируйте с помощью микроскопа.

Примечание 1: не дожидайтесь высыхания капли, поскольку образуются кристаллы нигрозина, которые могут помешать интерпретации результатов.

Примечание 1: в случае преципитации нигрозина в образце спермы (редко происходит в вязких образцах) рекомендуется работать только с эозином (Реагент 1) и не использовать нигрозин (Реагент 2) (после этапа 2 перейдите к этапу 4).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- бесцветные сперматозоиды – живые сперматозоиды
 - сперматозоиды, окрашенные в красный цвет – мертвые сперматозоиды
- Проанализируйте микроскопные поля на всем предметном стекле и посчитайте от 100 до 200 клеток. Определите число живых и мёртвых сперматозоидов.
- Результат необходимо считать незамедлительно, т.к. слишком долгая задержка приведет к уменьшению процента жизнеспособных сперматозоидов.

Информация о том, живые или мертвые неподвижные сперматозоиды, является клинически значимой. Результаты определения жизнеспособности должны оцениваться в сочетании с результатами определения подвижности одного и того же образца спермы. Присутствие значительной части живых, но неподвижных клеток может указывать на структурные дефекты жгутика, а высокий процент неподвижных и мертвых клеток (некрозооспермия) может указывать на патологию придатков яичка (ВОЗ 2010).

Образец спермы считается нормальным, если 58 % и более сперматозоидов являются живыми (ВОЗ 2010).

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Сперматозоиды, окрашенные во время проведения теста VitalScreen, не могут использоваться в каких-либо дальнейших процедурах.

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Хранить реагенты в защищенном от света месте при температуре 2-25 °С. Набор можно транспортировать или хранить при повышенных температурах в течение короткого периода (до 5 суток при 37 °С).

Набор годен к использованию в течение 24 месяцев с даты производства.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Все человеческие и органические образцы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами всегда используйте защитную одежду и перчатки.

БИБЛИОГРАФИЯ

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, WHO, 5th edition, 2010



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Беернем – Бельгия
Электронная почта: info@fertipro.com
Веб-сайт: www.fertipro.com



Spermac Stain

Реагенты для окрашивания сперматозоидов человека



Документ №: FP09 I21 R01 C.9

Обновление: 02.10.2020 г.

ТОЛЬКО ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. РЕАГЕНТЫ ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Spermac Stain представляет собой качественный диагностический набор для окрашивания сперматозоидов человека. Окрашивание сперматозоидов предназначено для обеспечения дифференцирования морфологически нормальных от аномальных сперматозоидов.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Определение и критерии нормальности по большей части основаны на исследованиях, проведенных на сперматозоидах, полученных из репродуктивного тракта женщин (особенно в посткоитальной цервикальной слизи), которые определены как нормальные. Тем не менее, были предложены иные критерии, из которых основными являются критерии ВОЗ (1) и критерии Тигерберга (или строгие критерии) (2, 3).

Набор Spermac Stain позволяет оценить морфологию, поскольку он помогает различить различные части сперматозоида (голова, акросома, экваториальный сегмент, средняя часть и хвост), облегчая дифференцирование нормального сперматозоида от аномального (4, 5).

Набор Spermac Stain может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Краситель А: красный краситель – 50 мл или 250 мл
- Краситель Б: бледно-зеленый краситель – 50 мл или 250 мл
- Краситель С: темно-зеленый краситель – 50 мл или 250 мл
- Фиксатор: 50 мл или 250 мл

Сертификат анализа и паспорт безопасности: по запросу

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Стеклянная посуда
- Камеры Коплина
- Микроскоп (1000х увеличение)
- Масло иммерсионное
- Нагревательный столик 37 °C
- Вода дистиллированная/водопроводная

ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Красители из набора Spermac Stain должны храниться в закрытых камерах Коплина или в оригинальных флаконах при температуре 2-25 °C. Реагенты годны к использованию в течение 36 месяцев с даты производства, если они не использовались. Тем не менее, процедуры окрашивания приводят к удалению компонентов красителей и вносят загрязнители в реагенты. Таким образом, красители следует заменить, если не достигается

адекватное окрашивание. В случае, если наблюдается выпадение красителей в осадок, отфильтруйте реагенты.

МЕТОД



Рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачайте по ссылке на нашем сайте или отсканируйте штрих-код):

ПОДГОТОВКА

Налейте реагенты в камеры Коплина. Убедитесь, чтобы уровень жидкости был достаточным для покрытия окрашиваемой площади слайда (предметного стекла). Наполните камеру с фиксатором только после того, как слайды уже подготовлены, высушены и готовы для окрашивания. Наполните пятую камеру Коплина или любую иную емкость, в которой можно выдерживать предметные стекла, дистиллированной/проточной водой (для промывки слайдов между окрашиванием различными красителями). Если применяемая проточная вода является щелочной ($\text{pH} > 7$), то для промывки используйте дистиллированную воду.

Очистите и промойте предметные стекла спиртом и высушите их перед использованием.

ОБРАЗЕЦ

Период воздержания должен составлять 2-7 дней. Избегайте потери первой фракции спермы, поскольку она содержит пропорционально больше нормальных сперматозоидов. Не выдерживайте образец спермы более 4 ч после эякуляции перед началом теста.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Поместите тонкий слой (со скошенной кромкой) свежей, неразбавленной, предпочтительно сжиженной спермы на стекло. Просушите на воздухе в течение 5 минут на подогреваемом столике при температуре 37 °C.

Примечание: Не готовьте мазки и не высушивайте их вблизи открытой емкости с фиксатором, поскольку даже самые незначительные количества его паров повлияют на окрашивание. Держите емкость с фиксатором закрытой как можно дольше.

2. Зафиксируйте мазок путем погружения слайда (препарата) по крайней мере на 5 минут в камеру Коплина, содержащую фиксатор. Более длительное фиксирование допустимо, но не обязательно.
3. Извлеките слайд из фиксатора, удалите излишки фиксатора со слайда, на короткое время поставив его вертикально на впитывающую бумагу. Не касайтесь бумагой поверхности мазка. Просушите слайд в течение 15 минут на подогреваемом столике при температуре 37 °C. В это время вынесите камеру Коплина, содержащую фиксатор, из рабочей зоны, в которой проводится тест.
4. Осторожно промойте слайд, аккуратно погружая его 7 раз в дистиллированную/водопроводную ($\text{pH} < 7$) воду. Убедитесь в достаточном объеме контейнера и количестве воды в нем для полного смывания фиксатора со слайдов (если окрашивать более 5 слайдов в держателе). Если контейнер для промывки слайдов небольшой (напр., камера Коплина), повторите процедуру промывки в свежей воде. Осторожно удалите воду со слайда, на короткое время прикоснувшись торцом слайда к впитывающей бумаге.
5. Окрашивайте в течение 2 минут в Красителе А. Помещая слайд в раствор красителя, медленно погрузите его 7 раз (1 секунда – погружение, 1 секунда – извлечение) для

достижения полного контакта образца с красителем. Затем оставьте слайд в растворе до завершения периода окрашивания. Поместите слайд вертикально на впитывающую бумагу. Промойте, как указано выше в п.4, погружая 7 раз в свежую проточную воду. Осторожно удалите воду со слайда, на короткое время прикоснувшись торцом слайда к впитывающей бумаге.

6. Повторите промывание в свежей воде. Такое двойное промывание после Красителя А важно. Осторожно удалите воду со слайда, на короткое время прикоснувшись кончиком к впитывающей бумаге.
7. Окрашивайте в течение 1 минуты в Красителе Б. Помещая слайд в раствор красителя, медленно погрузите его 7 раз (1 секунда – погружение, 1 секунда – извлечение) для достижения полного контакта образца с красителем. Поместите слайд вертикально на впитывающую бумагу. Промойте, как указано выше, в свежей проточной воде. Все манипуляции производите, как описано в п.5.
8. Окрашивайте в течение 1 минуты в Красителе С. Помещая слайд в раствор красителя, медленно погрузите его 7 раз (1 секунда – погружение, 1 секунда – извлечение) для достижения полного контакта образца с красителем. Поместите слайд вертикально на впитывающую бумагу. Промойте, как указано выше, в свежей проточной воде. Все манипуляции производите, как описано в п.5.
9. Оставьте мазок на воздухе для просушивания.
10. Поместите слайд под световой микроскоп (1000х увеличение), используя иммерсионное масло, и проведите оценку окрашивания:
 - Акросома = темно-зеленая окраска
 - Ядро = красная окраска
 - Экваториальная часть = бледно-зеленая окраска
 - Средняя часть и хвост = зеленая окраска

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Сосчитайте по крайней мере 100 (предпочтительно 200) сперматозоидов и классифицируйте их на нормальные и аномальные, указывая наиболее распространенные дефекты.
- Учитывайте только идентифицируемые сперматозоиды.
- Критерии классификации сперматозоидов на нормальные и аномальные зависят от метода классификации, используемого в лаборатории (ВОЗ 2010).
- В соответствии с руководством ВОЗ, по критериям ВОЗ 2010г. образец считается нормальным, если по крайней мере 4 % сперматозоидов имеют нормальные формы (1).

С помощью строгого применения определенных критериев морфологии сперматозоидов была установлена взаимосвязь между процентным содержанием нормальных форм и различными конечными точками фертильности (время до наступления беременности, показатели беременности *in vivo* и *in vitro*), которые могут быть полезными для прогноза фертильности (ВОЗ 2010г.).

ЗАЛИВКА СЛАЙДОВ

При заливке слайдов окрашивание будет терять интенсивность под воздействием заливочной среды (через несколько недель). Таким образом, не заливайте слайды, если Вы планируете обратиться к ним через некоторое время. Осторожно удалите иммерсионное масло, которое также вызывает обесцвечивание слайдов. При необходимости работы со слайдами впоследствии предпочтительно делать дубликаты слайдов или вести фото/видео запись.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все образцы спермы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита.
- Фиксатор содержит формальдегид: токсичен при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Может вызвать аллергическую кожную реакцию; подозревается в возникновении генетических дефектов; может вызвать рак.
- Краситель А и Краситель В: легковоспламеняющаяся жидкость и пар.
- Всегда надевайте защитную одежду при работе с образцами и реагентами (перчатки, лабораторный жилет, средства защиты глаз / лица).
- Все остальные компоненты не являются токсичными.

ПРИМЕЧАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

- Белковоподобные или гелеобразные образцы и замороженные образцы должны быть предварительно разведены в соотношении 1:1 цитратом натрия (3%) до нанесения мазка.
- Окрашенный слайд должен быть прозрачным, и иметь лишь слегка зеленоватый оттенок. Если цвет слайда – темно-зеленый, это говорит о воздействии паров фиксатора на образец до фиксирования.
- Для транспортировки до окрашивания слайды могут быть подготовлены, зафиксированы, промыты и высушены. Во время транспортировки защищайте их от трения. При готовности проводить окрашивание, начните процесс с этапа фиксации (этап 2), т.е. образцы пройдут двойной процесс фиксации. Это является важным, поскольку фиксатор содержит буферные компоненты, обеспечивающие правильность последующего окрашивания.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition, WHO, 2010
2. Menkveld R, Kruger TF (1991). Atlas of human morphology, Williams and Wilkins, Baltimore.
3. Menkveld R, Stander FSH (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, Human Reproduction 5(5): 286-92
4. Oettlé EE(1986). An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state, Development, Growth and Differentiation (Suppl.): 28
5. Chan PJ, Corselli JU, Jacobson JD, Patton WC, King A (1999). Spermac stain analysis of human sperm acrosomes. Fertility and Sterility 72 (1): 124-128.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Беернем
Бельгия

EpiScreen Plus™

Диагностический набор для количественного определения содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в сперме (семенной плазме) человека (25 тестов)

Документ №: FP09 I87 R01 B.5

Обновление: 01.07.2020 г.

СОКРАЩЕНИЯ

CLSI – Институт клинических и лабораторных стандартов.

CV – коэффициент вариации

IVD – Для диагностики in vitro (для лабораторной диагностики)

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

НАГ – нейтральная альфа-глюкозидаза

ОП – оптическая плотность

PNP – пара (4)-нитрофенол

PNPG – пара (4)-нитрофенил-альфа-D-глюкопиранозид

SDS – натрия додецилсульфат

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

СФЕРА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

EpiScreen Plus™ представляет собой диагностический набор для лабораторной диагностики (IVD), предназначенный для количественного определения содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в сперме (семенной плазме) человека. С помощью одного набора EpiScreen Plus™ можно измерить ферментативную активность не менее 25 образцов.

Только для профессионального использования.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Основная доля активности альфа-глюкозидазы в сперме, а конкретнее – ее нейтрального изофермента, зависит от секреции придатками яичка (1). У пациентов с азооспермией и нормальным уровнем андрогенов в периферической крови активность нейтральной альфа-глюкозидазы в семенной плазме является надежным маркером вклада придатков яичка в эякулят.

У мужчин с азооспермией при двухсторонней обструкции между придатками яичка и эякуляторным каналом наблюдаются очень низкая активность альфа-глюкозидазы в семенной плазме (2). В то же время, если азооспермия вызвана нарушениями процесса сперматогенеза (задержкой созревания сперматозоида) или обструкцией между придатками яичка и сетью яичка, или в самой сети яичка, активность альфа-глюкозидазы находится в норме. Таким образом, определение содержания нейтральной альфа-глюкозидазы в семенной плазме нормально вирилизированных мужчин с азооспермией позволяет дифференцировать основные причины данного состояния (3, 4).

Низкая активность нейтральной альфа-глюкозидазы в семенной плазме пациентов с олигозооспермией может отражать частичную обструкцию придатков яичка, ассоциированную с инфекциями или воспалительным заболеванием (2, 5). Ферментативная активность у пациентов с нормальной концентрацией сперматозоидов коррелирует с результатами окрашивания по Шору средней части и хвоста сперматозоида, что отражает изменения в мембране сперматозоида, вызываемые эпидидимальной секрецией (5).

Тест EpiScreen Plus™ может способствовать постановке диагноза и ведению мужского бесплодия.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Принцип теста основан на следующей реакции:

PNPG + альфа-глюкозидаза → альфа-D-глюкопиранозид + PNP (желтый)

При определенных условиях (рН=6,8; T=37 °C), 1 МЕ (международная единица) альфа-глюкозидазы за одну минуту высвобождает 1 мкМ PNP (пара (4)-нитрофенола) из субстрата PNPG (пара (4)-нитрофенил-альфа-D-глюкопиранозид) (7). Желтое окрашивание PNP можно измерить спектрофотометрически на длине волны 405 нм. Активность альфа-глюкозидазы выражается в виде МЕ/л (или мМЕ/мл).

Реакционный буфер содержит SDS (натрия додецилсульфат), который селективно ингибирует кислотную форму альфа-глюкозидазы, источником которой является предстательная железа. Это позволяет проводить специфичное определение активности нейтрального фермента (6).

Ингибирование: Глюкоза ингибирует альфа-глюкозидазу, присоединяясь к моносахарид-связывающему участку альфа-глюкозидазы (8). Данный процесс ингибирования зависит от рН и дозы, и лежит в основе приготовления контрольных проб спермы (семенной плазмы).

ТИПЫ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить на свежих или замороженных/размороженных образцах спермы и семенной плазмы.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Реагент 1 (5 мл): реакционный буфер (рН 6,8), содержащий 1% SDS
- Реагент 2 (0,25 мл): 50X раствор субстрата (PNPG в ДМСО)
- Реагент 3 (5 мл): раствор ингибитора (реакционный буфер, содержащий глюкозу)
- Реагент 4 (60 мл): останавливающий буфер (0,02 М NaOH)
- Реагент 5 (1 мл): основной раствор стандарта (5 мМ PNP)
- Реагент 6 (60 мл): буфер для разбавления стандартов (0,02 М NaOH + 0,1% SDS)

Сертификат анализа и паспорт безопасности (MSDS) доступны по запросу или могут быть загружены с веб-сайта www.fertipro.com.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- Планшетный или кюветный фотометр (фильтр 405 нм)
- Дозаторы, наконечники
- Микропланшет
- Пробирки Эппендорфа на 1,5 мл
- Водяная баня /термошейкер

ХРАНЕНИЕ, ТРАНСПОРТИРОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

Набор можно транспортировать или хранить в течение короткого периода при повышенных (до 5 суток при 37 °C).

Набор EpiScreen Plus™ следует хранить при температуре 2-8 °C в защищенном от света месте. Набор годен к использованию в течение 24 месяцев с даты производства (даже после вскрытия флаконов). Не использовать после истечения срока годности.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Параметры валидации были рассчитаны в соответствии с новейшими руководствами CLSI (9,10).

Диапазон измерения: 2,32 – 144 мМЕ/мл	
Коэффициент вариации в пределах одного анализа: 3,08 %	Чувствительность: 96,0 % *
Коэффициент вариации для серии анализов: 10,52 %	Специфичность: 93,6 % *
Нижнее пороговое значение активности: 6,35 мМЕ/мл	
Нижнее пороговое значение ВОЗ: 20 мМЕ/эякулят (в случае коррекции на объем эякулята)	

* вазэктомированные/нормозооспермические

ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

Не используйте продукт, если защитный колпачок флакона снят или поврежден при доставке продукта. При хранении при температуре 2-8 °С в Реагенте 1 возможно выпадение осадка, который исчезает после предварительного нагревания до 37 °С.

МЕТОД



Рекомендуем посмотреть наше демонстрационное видео (скачать по ссылке на нашем сайте или отсканировать штрих-код):

Примечание 1: ВОЗ рекомендует применять для коррекции фона только две внутренние контрольные пробы. Поскольку вариация фона в образцах спермы достаточно велика ($\pm 20\%$), рекомендуем готовить отрицательную контрольную пробу для каждого образца спермы (семенной плазмы) для корректной и воспроизводимой коррекции фона.

Примечание 2: В тесте используется нагрев реагентов и образцов. Для оптимального прогрева проб всегда используйте водяную баню с терморегулятором или термошейкер/твердотельный нагреватель для реакционных пробирок. НЕ проводите инкубацию в суховоздушном инкубаторе, поскольку это может отрицательно повлиять на результаты анализа.

Выполните следующие шаги:

1. Нагреть Реагенты 1, 2 и 3 до 37 °С в течение 30 мин в водяной бане (или термошейкере или в твердотельном нагревателе).
2. Для каждого анализируемого образца спермы (семенной плазмы):
 - Приготовить реакционный раствор: 3 мкл раствора субстрата (Реагент 2) в 147 мкл реакционного буфера (Реагент 1).
 - Приготовить ингибирующий раствор: 3 мкл раствора субстрата (Реагент 2) в 147 мкл раствора ингибитора (Реагент 3).
3. Внести по 20 мкл каждого образца спермы (семенной плазмы) в две пробирки типа Eppendorf на 1,5 мл.
4. Добавить 130 мкл реакционного раствора в одну пробирку и 130 мкл ингибирующего раствора в другую (для отрицательного контроля).
5. Перемешать на вихревой мешалке и инкубировать ровно 2 ч при 37 °С в водяной бане или в твердотельном нагревателе.
6. Во время инкубации образцов спермы (семенной плазмы) приготовить растворы для построения калибровочной (стандартной) кривой PNP следующим образом:
 - а. Приготовьте стандартный раствор с самой высокой концентрацией (200 мкМ) путем разбавления 100 мкл основного раствора стандарта (Реагент 5) в 2400 мкл буфера для разбавления стандартов (Реагент 6).

б. Используйте этот раствор для приготовления других стандартов, как указано в нижеприведенной таблице. Реагент 6 (без разведений/добавок) используется как «нулевой» стандартный раствор (бланк, пустая проба).

Таблица: Разведения стандартов PNP для калибровочной кривой

Конечная концентрация (мкМ) стандарта PNP	Стандарт «200 мкМ» (мкл)	Реагент 6
200 мкМ	500 мкл	0 мкл
150 мкМ	375 мкл	125 мкл
100 мкМ	250 мкл	250 мкл
50 мкМ	125 мкл	375 мкл
10 мкМ	25 мкл	475 мкл
0 мкМ (=бланк)	0 мкл	500 мкл

7. Через 2 ч инкубации образцов (реакционного раствора и ингибирующего раствора) остановить реакцию путем удаления пробирок из водяной бани или из твердотельного нагревателя, добавить 1 мл останавливающего буфера (Реагент 4), и перемешать с использованием вихревой мешалки (вортекса).

8. Внести по 200 мкл всех стандартов (приготовленных на шаге 6) и образцов в лунки планшета.

9. Измерить оптическую плотность (ОП) на длине волны 405 нм.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматизированного расчета результатов рекомендуется использовать таблицу Excel, которую можно скачать с сайта FertiPro:

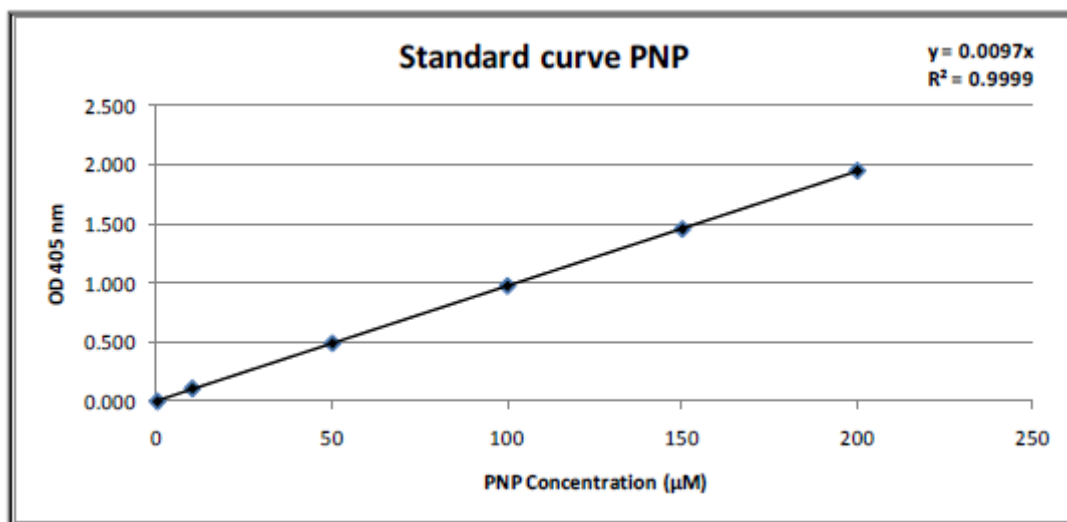
<http://www.fertipro.com/index.php?page=diagnostics&sub=epiplus>

Принцип расчета:

1. Скорректируйте все измеренные значения ОП на пустую пробу (бланк) (0 мкл стандарта PNP). Только эти скорректированные значения будут использоваться в дальнейших расчетах.
2. Рассчитайте стандартную кривую PNP: концентрации стандартных растворов по оси X, значения скорректированной ОП по оси Y. Постройте график линейной регрессии для вычисления коэффициента наклона калибровочной кривой. Коэффициент детерминации R^2 должен быть $\geq 0,99$.
3. Для каждого реакционного образца: скорректируйте на фон семенной плазмы (=скорректированная ОП_{реакционного образца} - скорректированная ОП_{ингибитора}).
4. Используйте уравнение кривой регрессии для расчета концентрации PNP неизвестного образца.
(концентрация PNP = скорректированное на фон значение ОП / коэффициент наклона кривой)
5. Рассчитайте активность фермента (мМЕ/мл) путем умножения полученного значения концентрации PNP на 0,479 (см. ниже раздел «Коэффициент коррекции»). Рассчитанное значение активности фермента можно умножить на объем эякулята для оценки активности фермента во всем эякуляте.

Пример расчета

Полученные данные и стандартная кривая:



Коэффициент наклона калибровочной кривой = 0,0097 (уравнение кривой $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$.

ОП_{нулевого стандарта} (0 мкл стандарта PNP) = 0,045

ОП_{реакционного образца} = 0,845; → корреktированное на фон: $0,845 - 0,045 = 0,800$

ОП_{ингибитора} = 0,060; → корреktированное на фон: $0,060 - 0,045 = 0,015$

Корреktированное на фон значение ОП_{образца} = $0,800 - 0,015 = 0,785$

Концентрация PNP = $0,785 / 0,0097 = 80,93$ мкМ;

Активность фермента на мл = $80,93 \times 0,479 = 38,76$ мМЕ/мл

Активность фермента на эякулят = $38,76$ мМЕ/мл $\times$ объем эякулята (мл)

***Примечание 1:** Стандартная кривая включает точки в диапазоне от 0 до 200 мкМ, поскольку концентрация PNP в большинстве образцов спермы находится в этих пределах. Экспериментально подтверждена линейность кривой до 300 мкМ. При желании можно изменить калибровочную кривую до 300 мкМ, что соответствует активности фермента 144 мМЕ/мл.*

***Примечание 2:** Коэффициент коррекции 0,479 был получен, исходя из коэффициента разбавления пробы и времени инкубации (120 мин):*

В анализе используются образцы спермы объемом 20 мкл, которые разбавляются до 1150 мкл (20 мкл пробы спермы + 130 мкл реакционного буфера + 1000 мкл останавливающего буфера), что дает коэффициент разбавления 57,5. Одна единица активности фермента определяется как образование 1 мкМ PNP за минуту. Таким образом, для вычисления активности в минуту коэффициент разбавления нужно разделить на 120. Это дает коэффициент коррекции, равный 0,479.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Данный тест является вспомогательным средством для диагностики и, как и для других биологических тестов, интерпретация результатов должна проводиться в рамках клинических результатов и данных анамнеза. Необходимо исключить другие причины недостаточности эпидидимальной секреции, как, например, андрогенную недостаточность или атрофию яичек в тяжелой форме.

Все материалы необходимо утилизировать безопасным образом в соответствии с местными/национальными нормами.

Все человеческие и органические материалы должны рассматриваться в качестве потенциально опасных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись

возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами и реагентами всегда используйте защитную одежду, защиту глаз/лица и перчатки.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jöckenhovel F, and Nieschlag E. (1990) Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int. J. Androl.*, 13: 297-305.
2. Guerin JF, Ben Ali H, Rollet J, Souchier C, and Czyba JC. (1986) Alphaglucohydrolase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J. Androl.*, 7: 156-162
3. Casano R, Orlando C, Caldini AL, Barni T, Natali A, and Serio M. (1987) Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha 1-4-glucosidase and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligospermic patients. *Fertil. Steril.*, 47: 324-328
4. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, and Nieschlag E. (1988) Epididymal markers in human infertility. *J. Androl.*, 9: 91-101
5. Haidl G, Badura B, Hinsch KD, Ghyczy M, Gareiss J, Schill WB. (1993) Disturbances of sperm flagelle due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum. Reprod.*, 7: 1070-1073
6. Paquin R, Chapdelaine P, Dubé JY, Tremblay RR (1984) Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-glucosidase. *J. Androl.*, 5: 227-282
7. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition. Measurement of neutral alpha-glucosidase in seminal plasma. pp. 134-136
8. Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29
9. Shrivastava A, Vipin B, Gupta VB (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2: 21-25
10. Chesher D. (2008) Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem. Rev.*, 29: S23-S
11. Eertmans F, Bogaert V, Van Poecke T, and Puype B. (2014) An Improved Neutral α -Glucosidase Assay for Assessment of Epididymal Function – Validation and Comparison to the WHO Method. *Diagnostics*. 4: 1-11

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:



FertiPro N.V.
Industriepark Noord 32
8730 Беернем
Бельгия



EPI_PLUS

FertiCult™ Mineral Oil

Легкое минеральное масло для использования в процедурах ЭКО, ИКСИ и сопутствующих процедурах ВРТ

STERILE A

Стерилизовано с помощью стерилизующей фильтрации

Документ №: FP09 I20 R01 A.17

Обновление: 20.12.2019 г.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ВМИ – внутриматочная инсеминация

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

FertiCult™ Mineral Oil представляет собой дважды промытое водой, готовое к использованию легкое минеральное масло (плотность = 0,83–0,86 г/мл) для применения в процедурах ЭКО, ИКСИ и сопутствующих процедурах вспомогательных репродуктивных технологий.

СОСТАВ

Минеральное масло (парафиновое масло) (Монография Евр.Фарм: 0240, код CAS: 8042-47-5).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Использование культуральных сред, покрытых маслом, было впервые применено в начале 1960-х годов в качестве техники культивирования эмбрионов млекопитающих. Применение масла позволяет использовать небольшие количества среды для оплодотворения и культивирования эмбрионов. Использование масла предотвращает испарение среды, тем самым снижая неблагоприятное воздействие повышенной осмоляльности. Более того, покрытие маслом снижает температурные флуктуации и изменения pH, вызванные потерей CO₂ в среде при извлечении культуральных плашек из инкубатора для оценки эмбрионов или микроманипуляций.

Также культивирование нескольких эмбрионов в малых объемах покрытой маслом среды способствует концентрированию аутокринных факторов роста, выделяемых развивающимися эмбрионами, что улучшает показатели развития эмбриона.

Только для профессионального применения.

МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

Каталожный номер	В стеклянных флаконах:
MINOIL050	1 фл. x 50 мл FertiCult™ Mineral Oil
MINOIL100	1 фл. x 100 мл FertiCult™ Mineral Oil
MINOIL500	1 фл. x 500 мл FertiCult™ Mineral Oil

<u>Каталожный номер</u>	<u>Во флаконах из ПЭТГ с завинчивающейся крышкой:</u>
MINOIL050P	1 фл. х 50 мл FertiCult™ Mineral Oil
MINOIL100P	1 фл. х 100 мл FertiCult™ Mineral Oil
MINOIL500P	1 фл. х 500 мл FertiCult™ Mineral Oil

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В НАБОР

- CO₂-инкубатор на 37 °C
- Чашки Петри
- Культуральные среды
- Ламинарный шкаф (класса 5 ISO)
- Микроскоп
- Пробирки

СПЕЦИФИКАЦИЯ ПРОДУКТА

- | | |
|---|---|
| • Плотность : | 0,83–0,86 г/мл |
| • Вязкость: | < 30 сР при 30 °C |
| • Бактериальные эндотоксины: | < 0,1 ЕЭ/мл |
| • Пероксидное число (POV): | < 0,1 мEq/кг |
| • Стерильность: | стерильно (SAL 10 ⁻³) |
| • Тест на эмбрионах мышей: | ≥ 80% бластоцист после
120 часов культивирования |
| • Минеральное (парафиновое) масло имеет фармацевтическое качество | |
| • Сертификат анализа и паспорт безопасности: | по запросу |

ПРОВЕРКА ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

- Не используйте продукт, если он проявляет любые признаки микробиологического загрязнения;
- Не используйте продукт, если защитный колпачок (защитная пленка) снят или поврежден при доставке продукта.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

- FertiCult™ Mineral Oil предварительно промыто. Не требуется дальнейшая подготовка.
- Совместимо со средами на основе бикарбонатного буфера, такими как среда GAIN и среда FertiCult™ IVF (FertiPro N.V.).
- Рекомендуется готовить чашки/флаконы с маслом за день до использования. Проинкубируйте их при 37 °C в CO₂-инкубаторе, чтобы масло нагрелось и стало насыщенным газом. При использовании флаконов удостоверьтесь, чтобы крышка флакона не была плотно закрыта, поскольку это предотвратит газовый обмен.
- Важно: каждая лаборатория должна следовать собственным оптимизированным и валидированным лабораторным процедурам.

ХРАНЕНИЕ И КОНСЕРВАЦИЯ

Хранить FertiCult Mineral Oil при температуре 15–25 °C. Также допускается хранение при температурах 2–15 °C, но это может вызвать определенную мутность, которая пропадает при повторном нагревании масла.

Продукт устойчив к случайной экспозиции повышенной температуре во время транспортировки ($\leq 37^{\circ}\text{C}$).

Не замораживать перед использованием.

Хранить в оригинальной упаковке или в защищенном от света месте, когда продукт не используется.

Продукт может быть безопасно использован в течение по крайней мере 28 дней после вскрытия флакона при соблюдении условий стерильности и хранении при комнатной температуре.

Не использовать после истечения срока годности. Хранить в защищенном от света месте, избегать экспозиции источникам излучения. Содержимое не может быть повторно стерилизовано после вскрытия.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все человеческие и органические образцы должны рассматриваться в качестве потенциально патогенных. Работайте со всеми образцами так, как если бы они являлись возможными переносчиками ВИЧ или гепатита. При обращении с образцами всегда используйте защитную одежду. Всегда работайте со строгим соблюдением условий гигиены во избежание возможной контаминации (напр., с использованием ламинарного шкафа класса ISO 5). Масло может выглядеть замутненным после его извлечения из инкубатора и выдерживания при комнатной температуре на протяжении длительного времени. Эта замутненность, как правило, исчезает, если масло повторно уравновесить путем помещения его в инкубатор на несколько часов; если замутненность не исчезнет, не используйте продукт.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Brinster R.L. (1963). A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell blastocyst. *Experimental Cell Research*, 32, 205-208.
2. Johnson C., Hofmann G., & Scott R. (1994). The use of oil overlay for in vitro fertilization and culture. *Assisted Reproductive Reviews*, 4, 198-201.
3. Kane M.T. (1987). Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology*, 27, 49-57.
4. Swain J.E., Cabrera L., Xu X. & Smith G.D. (2012). Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development. *Reproductive BioMedicine Online*, 24, 142-147.
5. Brinster R.L. (1968). In vitro culture of mammalian embryos. *Journal of Animal Science*, 27 (S1), 1-14.
6. Jin Y., Guo X.Z., Li L., Xie C.Y., & Tan L.L. (2001). The effect of autocrine factors on development of early embryos of mouse. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 34, 77-80.
7. Provo M.B., Herr C. (1998). Washed paraffin oil becomes toxic to mouse embryos upon exposure to sunlight. *Theriogenology*, 49, 214.
8. Eertmans F., Bogaert V., Volckaert D., Puype B. (2013). Validation of a potentiometric peroxide value (POV) assay for analysis of mineral oil with low oxidative content. *Journal of chemical and pharmaceutical Research* 5(11): 395-402.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:

FertiPro N.V.

Industriepark Noord 32

8730 Беернем – Бельгия

Тел. +32 (0)50 79 18 05

Факс +32 (0)50 79 17 99

Веб-сайт: www.fertipro.com

Электронная почта: info@fertipro.com

