

MARSCREEN®

Метод определения антиспермальных антител IgG при помощи шариков

(около 70 определений)

Принцип:

MarScreen® можно использовать для определения наличия или отсутствия на поверхности сперматозоидов антител IgG, применяя сочетание антисыворотки к IgG человека и латексных шариков, покрытых антителами IgG.

При прямом анализе *Direct MarScreen®* свежесобранная сперма, содержащая живые подвижные сперматозоиды, смешивается на предметном стекле с латексными шариками, покрытыми IgG.

Вторым этапом добавляется антисыворотка к IgG и перемешивается со смесью из спермы и шариков. Антисыворотка связывает IgG на поверхности шариков с IgG на поверхности сперматозоидов, если они на ней присутствуют. В результате латексные шарики соединяются между собой и со сперматозоидами, эти связи можно наблюдать в микроскоп. При наличии антител на поверхности сперматозоидов шарики будут к ним "прилипать". Таким образом, сперма с IgG на поверхности будет покрыта шариками. Шарики также образуют агрегации друг с другом.

При непрямом анализе *Indirect MarScreen®* живые подвижные сперматозоиды, отрицательные к антителам IgG, инкубируют вместе с сывороткой. Если в сыворотке присутствуют любые антиспермальные антитела, они свяжутся со сперматозоидами.

Вторым этапом смесь спермы и сыворотки смешивается на предметном стекле с латексными шариками, покрытыми IgG и далее протокол проводится таким же образом, как и при прямом анализе *Direct MarScreen®*.

Реагенты:

IgG Beads: 0,8 мл синих латексных шариков, связанных с человеческим IgG в белковом буферном растворе с 0,1% азида натрия. Готов к использованию. *Предупреждение: утилизировать с осторожностью.*

Antiserum: 0,8 мл (goat) антитела к IgG человека в белковом буферном растворе с 0,1% азида натрия. Готов к использованию. *Предупреждение: утилизировать с осторожностью.*

Необходимые материалы, не включенные в набор:

1. Светлопольный микроскоп с увеличением от 100X до 400X.
2. Центрифуга мощностью 500-600g.
3. Инкубатор 37°C.
4. Пробирки и штатив.
5. Устройство для пипетирования и наконечники.
6. Предметные и покровные стекла.
7. Счетная камера для сперматозоидов.
8. Инкубатор 56°C.
9. Среда для промывки спермы.
10. Контейнер для сбора спермы.

Хранение и стабильность:

Реагенты хранить при температуре от 2°C до 8°C. Использовать до даты истечения срока годности, указанной на этикетке. Срок годности - 18 месяцев с даты производства.

IgG Beads следует хранить в вертикальном положении.

Предупреждения и меры предосторожности:

Все образцы спермы и сыворотки относятся к биологически опасным материалам. С ними следует обращаться так, как и к носителям ВИЧ или гепатита. Утилизировать образцы необходимо в соответствии с положениями Закона о гигиене и безопасности (США).

Избегайте контакта крышек и краев флакона с латексными перчатками, на поверхности которых есть пудра или другие химикаты. Пудра и химикаты могут стать причиной контаминации содержимого флакона.

Сбор образцов:

Сбор спермы должен быть осуществлен в чистый контейнер. Образец спермы следует хранить при комнатной температуре до применения. Сперму следует исследовать в течение 3 (трех) часов после сбора.

Забор крови и ее хранение в виде сыворотки проводить при температуре от 2°C до 8°C, до 7 дней. Если время хранения превышает 7 дней, рекомендуется хранение в замороженном состоянии в морозильнике с точным поддержанием температуры. Избегать многочисленного замораживания и размораживания. Предварительно замороженный образец сыворотки необходимо полностью разморозить перед использованием.

Ограничения:

Direct MarScreen®: Нельзя использовать для теста сперму с малоподвижными или совсем неподвижными сперматозоидами. **Indirect MarScreen®:** Необходимо не менее 10 млн/мл подвижных сперматозоидов.

Подготовка к анализу Direct MarScreen :

1. Доведите реагенты до комнатной температуры.
2. Аккуратно взболтайте флакон с **IgG Beads**, избегая вспенивания, чтобы ресуспендировать шарики.

Процедура анализа Direct MarScreen®:

1. Нанесите 10 мкл свежесобранной спермы на предметное стекло.
2. Добавьте пипеткой на сперму 10 мкл **IgG Beads**. С помощью наконечника пипетки тщательно перемешайте шарики и сперму.
3. Добавьте 10 мкл **Antiserum** на смесь спермы и шариков. С помощью наконечника пипетки тщательно перемешайте смесь спермы и шариков с **Antiserum**.
4. Сверху на получившуюся смесь положите покровное стекло.
5. Через 2-3 минуты исследуйте стекло под микроскопом.
6. Отсчитайте 100 подвижных сперматозоидов и определите, связались ли шарики со сперматозоидами.

Подготовка сыворотки к анализу Indirect MarScreen®:

1. Доведите реагенты до комнатной температуры.
2. Аккуратно взболтайте флакон с **IgG Beads**, избегая вспенивания, чтобы ресуспендировать шарики.
3. Подготовка образца спермы:
 - 3.1. Дождитесь разжижения образца спермы.
 - 3.2. Добавьте среду в соотношении 2:1 к объему образца спермы и перемешайте. Например, для 2 мл спермы нужно добавить 4 мл среды для промывки спермы.
 - 3.3. Центрифугируйте 6 мин. с ускорением 600g, удалите супернатант и ресуспендируйте осадок сперматозоидов в 3 мл среды для промывки спермы
 - 3.4. Центрифугируйте 6 мин. с ускорением 600g, удалите супернатант и ресуспендируйте осадок сперматозоидов в небольшом объеме среды для промывки.
 - 3.5. Сосчитайте сперматозоиды и определите подвижность образца спермы после промывки.
 - 3.6. Разбавьте сперму до конечной концентрации 10-100 млн подвижных сперматозоидов/мл.

4. Подготовка сыворотки:

- 4.1. Нагрейте инактивированную сыворотку в инкубаторе при температуре 56°C в течении 30 мин.
- 4.2. Разбавьте сыворотку в пропорции 1:16 со средой для промывки спермы; например, добавьте 20 мкл сыворотки на 300 мкл среды.

Процедура для сыворотки при анализе Indirect MarScreen®:

1. Добавьте пипеткой 50 мкл разбавленной сыворотки в пробирку.
2. Добавьте 50 мкл суспензии донорских сперматозоидов в эту же пробирку. Аккуратно перемешайте. Закройте каждую пробирку и инкубируйте 60 мин. при 37°C.
3. Нанесите 10 мкл смеси сыворотки и спермы на предметное стекло.
4. Добавьте 10 мкл **IgG Beads** на смесь сыворотки и спермы. С помощью наконечника пипетки тщательно перемешайте шарики и смесь спермы и сыворотки.
5. Добавьте 10 мкл **Antiserum** на смесь сыворотки, спермы и шариков. С помощью наконечника пипетки тщательно все перемешайте.
6. Сверху накройте смесь покровным стеклом.
7. Через 2-3 минуты исследуйте стекло под микроскопом.
8. Отсчитайте 100 подвижных сперматозоидов и определите, связались ли шарики с поверхностью сперматозоидов.

Расчет процента общего связывания:

Подсчитайте только количество подвижных сперматозоидов и вычислите как указано ниже:

- несвязанные = шарики не прикрепились
- связанные = шарики прекрепились к сперматозоидам

Рассчитайте процент общего связывания:

$$\% \text{ общ. связывания} = \frac{\text{Кол-во сперматозоидов с прикрепившимися шариками}}{\text{Общее кол-во сперматозоидов}} \times 100\%$$

_____ : _____ увеличении 400X Á Á Á

• Á Á = 60

• Á Á = 40

 Á :

$\frac{40}{100} \times 100\% = 40\%$ Æ

Motrich RD, Cuffini C, Obert JPM, Maccioni M, Rivero VE. Chlamydia trachomatis occurrence and its impact on sperm quality in chronic prostatitis patients. J Infect 2006;53:175-181.

Munuce MJ, Quintero I, Ghersevich S, Berta CL. Comparative concentrations of steroid hormones and proteins in human peri-ovulatory peritoneal and follicular fluids. Reprod Biomed Online 2006;13:202-207.

Patel RP, Kolon TF, Huff DS, Carr MC, Zderic SA, Canning DA, Snyder HM. Testicular microlithiasis and antisperm antibodies following testicular biopsy in boys with cryptorchidism. J Urol 2005;174:2008-2010.

Motrich RD, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera CM, Rivero VE. Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular autoimmune response to prostate antigens. Hum Reprod 2005;20:2567-2572.

Munuce MJ, Marín-Briggiler CI, Caille AM, Berta CL, Cuasnicú PS, Morisoli L. Modulation of human sperm function by peritoneal fluid. Fertil Steril 2003;80:939-946.

Solis EA, Gatti VN, Brufman AS, Bouvet BR, Provenzal OC. [Advantages of a new kit for the determination of antisperm autoantibodies]. Arch Esp Urol 2000;53:363-6.

World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.