Instructions for use

Sanquin Reagents B.V.
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599
Fax: +31 20 5123570
Reagents@sanquin.nl
www.sanquin.org/reagents

MASPAT kit

REF K1360

IVD CE

053_v03 03/2022 (bg)

Само за професионална употреба

Анализ в твърда фаза за откриване на антитела към тромбоцити

Обща информация

MASPAT kit (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) съдържа MASPAT microplates с покритие (12 ленти с по 8 ямки), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control и MASPAT negative control. MASPAT kit отговаря на изискванията на приложимите стандарти и указания. Работните характеристики са описани в документите на изданието, които се предоставят с продукта при поискване. В принципа на теста заляга техниката с твърда фаза, основана на реакцията антиген-антитяло. Монослой от тромбоцити на донора се имобилизира чрез центрофугиране върху повърхността на ямките на микротитрационната плака, покрита със специфично за тромбоцити моноклонално антитяло от мишка. Серум от пациента и LISS (Low Ionic Strength Solution – разтвор с ниска йонна концентрация) се инкубират в съответните ямки, което позволява на серумните антитела да се свържат с имобилизирания монослой от тромбоцити. След инкубирането несвързаните компоненти на серума се отстраняват чрез промиване. Свързаните с тромбоцитите антитела се откриват чрез добавяне на моноклонален античовешки IgG от мишка и човешки еритроцити, сензибилизирани с IgG (MASPAT Indicator Red Cells), и последващо центрофугиране на микротитрационната плака. В случай на положителна реакция античовешкият IgG и MASPAT Indicator Red Cells се свързват с антителата IgG върху монослоя от тромбоцити. Така положителните реакции се характеризират със залепване на MASPAT Indicator Red Cells по цялата повърхност на ямките, а при отрицателните реакции се образуват зърна MASPAT Indicator Red Cells в средата на ямката. Силно препоръчително е включване на MASPAT positive control и MASPAT negative control при всяка серия тестове.

Части на комплекта:

MASPAT Microplate (REF K1366)**:** микротитрационната плака с U-образно дъно, състояща се от 12 ленти с по 8 ямки. Всички яки са покрити със специфични за тромбоцити моноклонални антитела (клон: tromb7 (6G9)). Съхранявайте при 2 – 8° C. MASPAT microplate е запечатан чрез вакуум в найлонова торбичка, съдържаща десикант. След изваждане от торбичката ямките може да се използват за период до 4 седмици, ако се съхраняват при 2 – 8° C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362)**:** Разтвор с ниска йонна концентрация. Съхранявайте при 2 – 8° C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363)**:** Съдържа специфични за тромбоцити антитела. Съхранявайте при 2 – 8° C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364)**:** Не съдържа специфични за тромбоцити антитела. Съхранявайте при 2 – 8° C.

MASPAT anti-IgG 6 mL (REF K1361)**:** Моноклонално антитяло от мишка, специфично за човешки IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Съхранявайте при 2 – 8° C.

Предпазни мерки

За използване само при in vitro диагностика. Реагентите трябва да се съхраняват при 2 – 8° C. Не може да се използват протекли или повредени ампули. Реагентите (затворени или отворени) не трябва да се използват след изтичане на срока им на годност, който е отпечатан върху етикета им. NaN_3 0,1% (w/v) като консервант. Въпреки че всички кръвни продукти са тествани за инфекциозни заболявания и резултатите са отрицателни, не може да се приеме, че реагентите не съдържат заразни вещества.
Трябва да внимавате при използването и изхвърлянето на всеки контейнер и съдържанието му. Помътняването може да указва микробиологично замърсяване. За да разпознаете дали реагентът е влошен, е препоръчително да го тествате като част от програмата за лабораторен качествен контрол, използвайки подходящи контроли. Изхвърлянето на отпадъците след завършване на изследването трябва да се извършва според правилата на лабораторията ви.

Вземане и приготвяне на проби

Серумните проби трябва да се получават от съсирена кръв след центрофугиране при 1500 rcf за 10 минути. Ако тестването на серума не се извършва веднага, той трябва да се съхранява при < -18° C.
В теста може да се използват тромбоцитни концентрати (Platelet Concentrates, PC) или обогатена с тромбоцити плазма (Platelet Rich Plasma, PRP). За приготвяне на PRP се центрофугира цяла кръв, взета в EDTA, при 400 rcf за 10 минути. Фракцията PRP може директно да се използва неразредена.

Процедура на теста

Необходими материали, които не се доставят:

- MASPAT Indicator Red Cells 0.3% (REF K1139) от сензибилизирани еритроцити в среда за съхранение.
- Многоканална пипета, подходяща за 50, 100 и 150 µL, и еднократни накрайници.
- Буфериран с фосфат физиологичен разтвор (PBS) и Tween 20.
- Резервоари за многоканална пипета.
- Еднократни ПЛАСТМАСОВИ пипети за прехвърляне.
- Центрофуга, подходяща за микротитрационни плаки.

- Инкубатор при 37° C.
- Смесител за микротитрационни плаки.

Оставете реагентите да достигнат стайна температура (18 – 25° C).

1. Извадете от торбичката микротитрационната плака MASPAT с необходимия брой ямки. Неизползваните ямки може да се съхраняват в найлоновата торбичка с десикант.
2. Добавете по 1 капка (50 µL) PRP или PC от донора чрез **пластмасовата** пипета за прехвърляне в необходимите ямки (за серум от пациента, MASPAT positive control, MASPAT negative control). Препоръчително е да извършите MASPAT positive и MASPAT negative control за всяка лента от 8 ямки.
3. Центрофугирайте микротитрационната плака 5 минути при 50 rcf, за да имобилизирате тромбоцитите върху повърхността на ямките **(без да спирате)**.
4. Декантирайте и отстранете всички несвързани тромбоцити, като промиете на ръка микротитрационните ямки 3 пъти със 150 µL PBS/Tween 0,005%. Промиващият разтвор трябва да се добавя на капки чрез многоканална пипета. Декантирайте PBS/Tween между отделните промивания, като обръщате и потупвате.
5. Добавете по 2 капки (100 µL) MASPAT LISS във всяка ямка. LISS има виолетов цвят.
6. Добавете по 1 капка (50 µL) MASPAT positive или negative control в съответните ямки.
7. Добавете по 1 капка (50 µL) серум от пациента в останалите ямки, съдържащи монослоеве тромбоцити от донора.
8. Разклатете в смесител за микротитрационни плаки в продължение на 10 секунди при 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). Виолетовият цвят на LISS трябва да премине в син.
9. Инкубирайте микротитрационната плака при 37° C за 30 минути (по време на инкубирането я запечатайте).
10. Декантирайте и промийте на ръка микротитрационните ямки 5 пъти със 150 µL PBS/Tween, както в стъпка 4.
11. Веднага след промиването добавете по 1 капка (50 µL) от реагента MASPAT anti-IgG във всяка ямка.
12. Добавете по 1 капка (50 µL) MASPAT Indicator Red Cells във всяка ямка. Разклатете внимателно.
13. Центрофугирайте микротитрационната плака при 200 rcf за 5 минути **(без да спирате)**.
14. След това реакциите вече може да се отчетат под микроскоп или с помощта на автоматичен четец.
    * Ако промиването е направено автоматично, препоръчително е да потвърдите стъпките за промиване.

Разчитане

Положителна или слабо положителна реакция (по дъното на ямката се образува пласт от еритроцити) указва наличие на специфични към тромбоцити и/или човешки левкоцитен антиген (human leukocyte antigen, HLA) антитела в серума.
Отрицателна реакция (по дъното на ямката се образува диск от еритроцити) указва отсъствие на специфични към тромбоцити и/или HLA антитела в серума.

положителна

слабо положителна

отрицателна

Трябва да се извърши MASPAT negative control, за да се определят автоантитела, свързани с тромбоцитите от донора.
Ако е необходима автоконтрола за пациента, серумът му трябва да се тества спрямо собствените му тромбоцити, получени от кръвната проба EDTA.

Повишаване на реактивността на тромбоцитите: замразяване на тромбоцитите от донора (PC или PRP) за период от най-малко 30 минути (< -18° C) ще повиши реактивността им. След замразяване, тромбоцитите могат да се съхраняват до 8 седмици.

PC може да се разреди със секвестринов буфер.
Състав на секвестриновия буфер в стандартния разтвор (концентрация 10x):

- 0,175 M $Na_2HPO_4.2H_2O$
- 0,089 M $Na_2EDTA.2H_2O$ (Titriplex III)
- 1,54 M NaCl

Разтворен в деминерализирана вода
pH: 6,8 – 7,0
Преди употреба секвестриновият буфер в концентрация 10x трябва да се разреди 1:10 с деминерализирана вода.
Съхранявайте на стайна температура (18 – 25°C). Срок на годност на стандартния разтвор: 1 година; на работния разтвор: 1 седмица.

Ограничения

Промиващият разтвор трябва да се добавя бавно, тъй като енергичното промиване може да отстрани както свързаните, така и несвързаните тромбоцити. Когато промиващата процедура е извършена правилно, повърхността на ямката трябва да е непрозрачна. Неравномерни отвори в монослоя от тромбоцити указват неправилна промиваща процедура. Ако това се случи, трябва да бъде направен нов монослой чрез нови микротитрационни ямки (стъпки 3 – 5).
Могат да възникнат грешно положителни или грешно отрицателни резултати при замърсяване на тестовите материали или отклонение от препоръчителната техника.
Могат да възникват грешно положителни резултати, ако по системата ABO тромбоцитите от донора/пациента не са съвместими с изследвания серум, ако има свързани автоантитела IgG с тромбоцитите от донора или ако концентрацията на тромбоцитите е твърде ниска (< 0,5 x 10^8/mL). За да изследвате дали към тромбоцитите от донора има свързани автоантитела, можете да извършите теста с тромбоцити от донора + отрицателна контрола или тромбоцити от донора + серум от донора.
Могат да възникнат грешно отрицателни резултати с MASPAT positive control , когато в използваните тромбоцити липсват антигените HPA-1a и HPA-3a.
Ако скоростта и времето на центрофугиране не са оптимизирани, тромбоцитите може да не прилепнат добре към микротитрационната плака. Недостатъчно оптималното покриване на ямките ще доведе до неправилни характеристики на теста, като понижи както чувствителността, така и силата на реакциите в окончателните резултати.
Недостатъчното промиване преди добавянето на реагента MASPAT anti-IgG и/или MASPAT Indicator Red Cells може да доведе до грешно отрицателни реакции.

Недостатъчното центрофугиране на микротитрационната плака след добавянето на MASPAT Indicator Red Cells може да доведе до грешно положителни резултати от всички тестове (включително с отрицателна контрола). Грешно положителните реакции може също да се дължат на неправилно ресуспендиране на MASPAT Indicator Red Cells.
Прекомерното центрофугиране на микротитрационната плака след добавянето на MASPAT Indicator Red Cells може да доведе до грешно отрицателни резултати от всички тестове (включително с положителна контрола).

References

Lown, J.A., Ivey, J.G., Evaluation of a solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. Department of Haematology, Royal Perth Hospital, Western Australia. (Transfus. Med. 1991).

Гарантира се ефективност на продуктите Sanquin като тази, описана в инструкциите за употреба на първоначалния производител. От съществено значение е строгото спазване на процедурите, тестовите постановки и препоръчителните реагенти и оборудване. Sanquin не поема никаква отговорност при отклонение от горепосоченото.