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 (da)

Kun til professionelt brug

Fast tilstandsform-analyse til påvisning af trombocyt-antistoffer

Generel information
MASPAT kittet (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) indeholder coatede MASPAT microplate (12 strips med 8 brønde), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control and MASPAT negative control. MASPAT kittet opfylder kravene til de pågældende standarder og retningslinjer. Ydelsesegenskaberne er nævnt i frigivelsesdokumentet, der kan leveres sammen med produktet på forespørgsel. Testens princip er fast tilstandsform-teknikken, der er baseret på antigen/antistofreaktion. Et monolag af donortrombocytter immobiliseres gennem centrifugering på overfladen af mikropladebrøndene, der er coatede med trombocytspecifikke monoklonale antistoffer fra mus. Patientserum og LISS (Low Ionic Strength Solution) inkuberes i de tilsvarende brønde og tillader derved serumantistoffer at binde sig til det immobiliserede trombocytmonolag. Efter inkubation fjernes ikke-bundne serumkomponenter ved vask. Trombocytbundne antistoffer påvises ved tilsætning af monoklonale anti-humane IgG- og humane IgG-sensibiliserede erythrocytter fra mus (MASPAT Indicator Red Cells) og efterfølgende centrifugering af mikropladen. I tilfælde af en positiv reaktion binder anti-humant IgG og MASPAT Indicator Red Cells til IgG-antistofferne på trombocytmonolaget. Positive reaktioner er således karakteriseret ved adhæsion af MASPAT Indicator Red Cells over hele brøndoverfladen, mens negative reaktioner producerer diskrete knapper af MASPAT Indicator Red Cells i midten af brønden. Det anbefales stærkt at tage MASPAT positive control and MASPAT negative control med i hver testserie.

Kittets dele:

MASPAT Microplate (REF K1366)**:** En mikroplade med U-bund bestående af 12 strips med 8 brønde. Alle brøndene er coatede med trombocytspecifikke monoklonale antistoffer. Opbevares ved 2–8°C. MASPAT mikropladen er vakuumforseglet i en plasticpose med desikkant. Efter at brøndene er taget ud af posen, kan de bruges i op til 4 uger, hvis de opbevares ved 2–8°C.

MASPAT LISS 10 ml (REF K1362)**:** Low Ionic Strength Solution. Opbevares ved 2–8°C.

MASPAT positive control 1 ml (REF K1363)**:** indeholder trombocytspecifikke antistoffer. Opbevares ved 2–8°C.

MASPAT negative control 1 ml (REF K1364)**:** indeholder ingen trombocytspecifikke antistoffer. Opbevares ved 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 ml (REF K1361)**:** monoklonale antistoffer fra mus specifikke for humant IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Opbevares ved 2–8°C.

Forholdsregler
Kun til in-vitro-diagnose. Reagenserne bør opbevares ved 2–8°C. Utætte eller beskadigede flasker må ikke bruges. Reagenser (uåbnede eller åbnede) må ikke anvendes efter den udløbsdato, der er trykt på flaskens etiket.
NaN_3 0,1% (volumenvægt) anvendes som konserveringsmiddel. Selv om alle blodprodukter testes for infektiøse sygdomme, og selv om de findes negative, kan det ikke garanteres, at reagenserne er fri for infektiøse stoffer.
Man skal være forsigtig ved brugen og bortskaffelsen af alle beholdere og deres indhold. Uklarhed kan være tegn på mikrobiel kontamination. For at finde tegn på forringelse af et reagens anbefales det, at man som en del af laboratoriets kvalitetssikringsprogram tester reagenset ved hjælp af passende kontroller. Bortskaffelse af affald efter fuldførelse af testen skal udføres i henhold til laboratoriets regulativer.

Prøveindsamling og forberedelse
Serumprøver skal opsamles fra koaguleret blod efter centrifugering ved 1500 rcf i 10 minutter. Hvis testning af serummet er forsinket, skal opbevaringen ske ved <-18°C.
Der kan bruges platelet concentrates (PC) eller platelet-rich plasma (PRP) i testen. Ved fremstilling af PRP centrifugeres fuldblod samlet i EDTA ved 400 rcf i 10 minutter. PRP-fraktionen kan bruges direkte ufortyndet.

Testprocedure
Nødvendige materialer, der ikke følger med ved leveringen:
- MASPAT Indicator Red Cells 0,3% (REF K1139) af sensibiliserede erythrocytter i konserveringsmiddel.
- Multikanalpipette beregnet til 50, 100 og 150 µl og engangsspidser.
- Fosfat-buffersaltvand (PBS) og Tween 20.
- Beholdere til multikanalpipetter.
- PLASTIK-overførselspipetter til engangsbrug.
- Centrifuge, der er velegnet til mikroplader.
- Inkubator 37°C.
- Mikropladerystebord.

Lad alle reagenser nå stuetemperatur (18–25°C).

1. Tag en MASPAT microplate med det ønskede antal mikropladebrønde ud af posen. Ubenyttede brønde kan opbevares i plastikposen med desikkanten.
2. Tilsæt 1 dråbe (50 µl) donor-PRP eller -PC med en overførselspipette af **plastik** til det nødvendige antal brønde (til patientserum, MASPAT positive control, MASPAT negative control). Det anbefales at udføre MASPAT positive og MASPAT negative control for hver strip med 8 brønde.
3. Centrifugér mikropladen i 5 minutter ved 50 rcf for at immobilisere trombocytterne på mikropladebrøndenes overflade **(uden ophold)**.
4. Dekantér og fjern alle ubundne trombocytter ved at vaske mikropladebrøndene manuelt 3* gange med 150 µl PBS/Tween 0,005%. Vaskeopløsningen skal tilsættes dråbevis ved hjælp af en multikanal-pipette. Dekantér PBS/Tween mellem vaskene ved at vende og ryste dem.
5. Tilsæt 2 dråber (100 µl) MASPAT LISS til hver brønd. LISS'en er purpurfarvet.
6. Tilsæt 1 dråbe (50 µl) MASPAT positive eller negative control til de tilsvarende brønde.
7. Tilsæt 1 dråbe (50 µl) patientserum til de resterende brønde, der indeholder donors trombocyt-monolag.
8. Ryst dem på et mikropladerystebord i 10 sekunder ved 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). LISS' purpurfarve skifter til blå.
9. Inkubér mikropladen ved 37°C i 30 minutter (forsegl mikropladen under inkubationen).
10. Dekantér og vask mikropladebrøndene manuelt 5* gange med 150 µl PBS/Tween som i trin 4.
11. Tilsæt 1 dråbe (50 µl) MASPAT anti-IgG reagens til hver brønd umiddelbart efter vask.
12. Tilsæt 1 dråbe (50 µl) MASPAT Indicator Red Cells til hver brønd. Ryst dem forsigtigt.
13. Centrifugér mikropladen ved 200 rcf i 5 minutter **(uden ophold)**.
14. Reaktionerne kan nu aflæses enten visuelt eller ved hjælp af en automatisk læser.

* Hvis vaskningen foretages automatisk, anbefales det at validere vasketrinene.

Fortolkning

En positiv eller svagt positiv reaktion (erythrocytter danner et lag over brøndbunden) indikerer tilstedeværelse af trombocyt- og/eller HLA-specifikke antistoffer i serummet.
En negativ reaktion (erythrocytter danner en knap i bunden af brønden) indikerer mangel på trombocyt- og/eller HLA-specifikke antistoffer i serummet.

positiv

svagt positiv

negativ

Der skal udføres MASPAT negative control for at bestemme auto-antistoffer bundet til donorens trombocytter.
Hvis auto-kontrol for en patient er påkrævet, skal patientens serum testes imod patientens egne trombocytter, der er udvundet ved en EDTA blodprøve.

Forbedring af trombocytternes reaktivitet: Nedfrysning af donorens trombocytter (PC eller PRP) i mindst 30 minutter (<-18°C) vil forbedre deres reaktivitet. Efter nedfrysning kan trombocytterne opbevares i op til 8 uger.

PC'er kan fortyndes med kelasteret buffer.
Sammensætning af opløsning af kelasteret buffer til opbevaring (10 x koncentreret):

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

Opløst i demineraliseret vand
pH: 6,8–7,0
Kelasteret buffer 10 x koncentreret skal fortyndes i forholdet 1:10 i demineraliseret vand før brug.
Opbevares ved stuetemperatur (18–25°C). Opløsningens lagerholdbarhed: 1 år; opløsning i brug: 1 uge.

Begrænsninger

Vaskeopløsningen skal tilsættes langsomt, da voldsom vask kan fjerne både bundne og ubundne trombocytter. Brøndoverfladen skal være uigennemsigtig, når vaskeproceduren er blevet udført korrekt. Uregelmæssige "huller" i trombocyt-monolaget indikerer en ukorrekt vaskeprocedure. Hvis dette er tilfældet, skal der laves et nyt monolag ved hjælp af nye mikropladebrønde (trin 3–5).
Falske positive eller falske negative resultater kan forekomme på grund af kontamination af testmaterialerne eller afvigelse fra den anbefalede teknik.
Falske positive resultater kan forekomme, hvis donorens/patientens trombocytter er AB0-uforenelige med det serum, der testes, hvis der er bundet IgG-auto-antistoffer til donortrombocytterne, eller hvis koncentrationen af trombocytter er for lav (<0,5 x 10^8/ml). For at teste om trombocyt-antistofferne bærer auto-antistoffer, kan testen udføres med donortrombocytter + negativ kontrol eller med donortrombocytter + donorserum.
Falske negative resultater kan forekomme med MASPAT positive control, hvis de anvendte trombocytter mangler antigenerne HPA-1a og HPA-3a.
Hvis centrifugeringshastigheden og tiden ikke er optimeret, kan der forekomme ringe trombocytadhæsion til mikropladen. Uoptimal coating af brøndene resulterer i en utilstrækkelig testydelse, idet både sensitiviteten og reaktionsstyrken i de endelige testresultater reduceres.
Utilstrækkelig vask før tilsætningen af MASPAT anti-IgG reagens og/eller MASPAT Indicator Red Cells kan resultere i falske negative reaktioner.
Undercentrifugering af mikropladen efter tilsætningen af MASPAT Indicator Red Cells kan føre til falske positive resultater i alle tests (herunder negativ kontrol). Falske positive reaktioner kan også være et resultat af, at MASPAT Indicator Red Cells ikke bliver korrekt resuspenderet.
Overcentrifugering af mikropladen efter tilsætningen af MASPAT Indicator Red Cells kan føre til falske negative resultater i alle tests (herunder positiv kontrol).

Referencer

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).

Det garanteres, at produkter fra Sanquin virker som beskrevet i producentens originale brugsanvisning. Det er af afgørende betydning, at procedurerne, testlayouts samt anbefalede reagenser og udstyr overholdes nøje. Sanquin fraskriver sig ethvert ansvar, som opstår som følge af nogen afvigelse heraf.