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 (fr)

Réservé à l'usage professionnel

Test en phase solide pour la détection d'anticorps antiplaquette

Informations générales
Le kit MASPAT (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) contient des microplaques de MASPAT (ASAT mitochondriale, ou ASATm) enrobées (12 bandes de 8 puits), du MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG positive control and MASPAT negative control. Le kit MASPAT est conforme aux exigences des normes et directives concernées. Les caractéristiques de performance sont citées dans la publication fournie avec le produit sur demande. Le principe du test s'appuie sur la technique de phase solide, elle-même basée sur une réaction antigène/anticorps. Une monocouche plaquettaire du donneur est immobilisée par centrifugation sur la surface des puits de la microplaque enrobée d'anticorps monoclonal murin spécifique à la plaquette. Le sérum du patient et la solution à faible densité ionique LISS (Low Ionic Strength Solution) sont incubés dans les puits appropriés, ce qui permet aux anticorps du sérum de se lier à la monocouche plaquettaire immobilisée. Après incubation, les composants sériques non-fixés sont éliminés par lavage. Les anticorps fixés aux plaquettes sont détectés par l'ajout d'IgG antihumain murin monoclonal et d'érythrocytes sensibilisés à l'IgG humain (MASPAT Indicator Red Cells), suivi d'une centrifugation de la microplaque. En cas de réaction positive, l'IgG antihumain et les "MASPAT Indicator Red Cells" se fixent sur les anticorps-IgG qui se trouvent sur la monocouche plaquettaire. Les réactions positives se caractérisent donc par l'adhérence de MASPAT Indicator Red Cells sur toute la surface des puits, tandis que les réactions négatives entraînent la formation de petits pellets de MASPAT Indicator Red Cells au milieu du puits. L'inclusion d'un MASPAT positive control and MASPAT negative control dans chaque série de tests est fortement recommandée.

Éléments du kit:

MASPAT Microplate (REF K1366)**:** microplaque à fond en U composée de 12 bandes de 8 puits. Tous les puits sont enrobés d'anticorps monoclonaux spécifiques aux plaquettes. Conservation entre 2–8°C. La microplaque MASPAT est scellée sous vide dans une pochette en plastique contenant un dessicant. Après retrait de la pochette, les puits peuvent être utilisés pendant une période allant jusqu'à 4 semaines à condition de les conserver entre 2–8°C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362)**:** solution à faible densité ionique.
Conservation entre 2–8°C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363) **:** contient des anticorps spécifiques aux plaquettes.
Conservation entre 2–8°C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364) **:** contient des anticorps non spécifiques aux plaquettes.
Conservation entre 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 mL (REF K1361) **:** anticorps monoclonal murin spécifique à l'IgG humain (IgG1, IgG2, IgG3). Conservation entre 2–8°C.

Précautions
Uniquement à usage de diagnostic in vitro. Les réactifs doivent être conservés entre 2–8°C. Les flacons endommagés ou présentant une fuite doivent impérativement être écartés. Les flacons de réactifs (fermés ou ouverts) ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption imprimée sur l'étiquette du flacon. NaN_3 0,1% (poids/volume) est utilisé comme agent de conservation. Bien que le test des produits sanguins ait révélé une absence totale de maladie infectieuse, il est impossible de garantir que le réactif est totalement exempt d'agents infectieux.
Il convient d'agir avec précaution lors de la manipulation et de l'élimination des conteneurs et de leur contenu. Une turbidité peut indiquer une contamination microbienne. Afin de détecter une détérioration des réactifs, il est recommandé de les analyser conformément au programme de contrôle de qualité du laboratoire, au moyen de tests appropriés. Au terme du test, l'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux directives de votre laboratoire.

Recueil des spécimens et préparation
Les **échantillons de sérum** doivent provenir de sang coagulé suite à une centrifugation à 1500 rcf pendant 10 minutes. Si l'analyse du sérum doit être postposée, il convient de le conserver à une température inférieure à <–18°C.
Il est possible d'utiliser des concentrés plaquettaires (PC) ou du plasma enrichi en plaquettes (PRP) pour l'analyse. Pour la préparation de PRP, du sang complet collecté dans de l'EDTA est centrifugé à 400 rcf pendant 10 minutes. La fraction PRP peut être utilisée directement, sans dilution.

Procédure de test
Matériel nécessaire mais non fourni :
- Suspension de MASPAT Indicator Red Cells 0,3% (REF K1139) d'érythrocytes sensibilisés dans un conservateur.

- Pipette multicanal adaptée pour 50, 100 et 150 µL et embouts jetables.
- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et Tween 20.
- Réservoirs pour pipette multicanal.
- Pipettes de transfert en PLASTISQUE jetables.
- Centrifugeuse adaptée pour les microplaques.
- Incubateur à 37°C.
- Agitateur de microplaque.

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (18–25°C).

1. Retirer la microplaque MASPAT contenant le nombre requis de puits de la pochette. Il est possible de conserver les puits inutilisés dans la pochette en plastique avec le dessicant.
2. Ajouter une goutte (50 µL) de PRP ou de PC du donneur à l'aide d'une pipette de transfert en **plastique** dans les puits nécessaires (pour sérum du patient, MASPAT positive control, MASPAT negative control). Il est recommandé d'effectuer les MASPAT positive control, MASPAT negative control pour chaque bande de 8 puits.
3. Centrifuger la microplaque pendant 5 minutes à 50 rcf afin de fixer les plaquettes sur la surface des puits de la microplaque **(sans freiner)**.
4. Décanter et éliminer les plaquettes non fixées en nettoyant les puits de la microplaque manuellement 3* fois à l'aide de 150 µL de PBS/Tween à 0,005%. La solution de lavage doit être ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une pipette multicanal. Décanter le PBS/Tween entre les lavages en retournant et en tapotant.
5. Ajouter 2 gouttes (100 µL) de MASPAT LISS à chaque puits. La LISS est de couleur pourpre.
6. Ajouter une goutte (50 µL) de MASPAT positive- ou negative control aux puits appropriés.
7. Ajouter une goutte (50 µL) de sérum du patient aux puits restants contenant des monocouches plaquettaires du donneur.
8. Agiter sur un agitateur de microplaque pendant 10 secondes à 800 tpm (Sarstedt, TPM-2). La couleur pourpre de la LISS doit virer au bleu.
9. Incuber la microplaque à 37°C pendant 30 minutes (sceller la microplaque durant l'incubation).
10. Décanter et laver les puits de la microplaque manuellement 5* fois à l'aide de 150 µL de PBS/Tween comme à l'étape 4.
11. Ajouter une goutte (50 µL) de réactif MASPAT anti-IgG à chaque puits immédiatement après le lavage.
12. Ajouter une goutte (50 µL) de MASPAT Indicator Red Cells à chaque puits. Agiter doucement.
13. Centrifuger la microplaque à 200 rcf pendant 5 minutes **(sans freiner)**.
14. Il est ensuite possible d'effectuer une lecture macroscopique des réactions ou de recourir à un lecteur automatique.
    * En cas de lavage automatique, il est conseillé de valider les étapes de lavage.

Interprétation

Une réaction positive ou positive faible (les érythrocytes forment une couche au fond du puits) indique la présence de plaquettes et/ou d'anticorps spécifiques au HLA dans le sérum.
Une réaction négative (érythrocytes d'un bouton au bas du puits) indique l'absence de plaquettes et/ou d'anticorps spécifiques HLA dans le sérum.

positive

positive faible

négative

Le MASPAT negative control doit être effectué afin de déterminer la présence d'auto-anticorps fixés sur les plaquettes du donneur.
Si un auto-contrôle du patient est requis, il convient de tester le sérum du patient par rapport aux plaquettes du patient dérivées d'un échantillon sanguin EDTA.

Amélioration de la réactivité des plaquettes : la réactivité des plaquettes (PC ou PRP) du donneur sera améliorée en les congelant au moins 30 minutes (température inférieure à <–18°C). Après la congélation, les plaquettes peuvent être conservées pendant jusqu'à 8 semaines.

Il est possible de diluer les PC à l'aide de tampon sequestrine.
Composition de la solution mère de tampon sequestrine (concentrée 10 x) :

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

Dissout dans un demi-volume d'eau
pH: 6,8 – 7,0
Le tampon sequestrine concentré 10 x doit être dilué dans un rapport 1:10 dans un demi-volume d'eau avant usage.
Conserver à température ambiante (18–25°C). Durée de stockage de la solution mère : 1 an ; solution active : une semaine.

Limites du test

Il convient d'ajouter la solution de lavage lentement car un lavage énergique risque d'éliminer les plaquettes fixées et non fixées. Quand la procédure de lavage a été effectuée correctement, la surface du puits doit être opaque. Des trous irréguliers dans la monocouche plaquettaire dénotent une procédure de lavage incorrecte. Si cela se produit, une nouvelle monocouche doit être créée à l'aide de nouveaux puits de microplaque (étapes 3 à 5).
Il existe un risque d'obtenir de faux résultats positifs ou négatifs suite à une contamination du matériel de test ou à un écart quelconque par rapport à la technique recommandée.
Il existe un risque d'obtenir de faux résultats positifs si les plaquettes du donneur ou du patient sont incompatibles ABO avec le sérum testé si les auto-anticorps IgG sont fixés sur les plaquettes du donneur ou si la concentration en plaquettes est trop faible (<0,5 x 10^8/mL). Pour déterminer si les plaquettes du donneur sont porteuses d'auto-anticorps, le test peut être effectué avec les plaquettes du donneur + contrôle négatif ou avec les plaquettes du donneur + sérum du donneur.
Il existe un risque d'obtenir des résultats faux négatifs avec le MASPAT positive control si les plaquettes utilisées manquent d'antigènes HPA-1a et HPA-3a.

Si la vitesse et le temps de centrifugation n'ont pas été optimisés, l'adhérence des plaquettes à la microplaque peut être médiocre. Un enrobage non optimal des puits entraîne des performances de test inadéquates en réduisant la sensibilité et la force des réactions dans les résultats de test finaux.
Un lavage insuffisant avant l'ajout de réactif MASPAT anti-IgG et/ou de MASPAT Indicator Red Cells peut entraîner de fausses réactions négatives.
Une centrifugation insuffisante de la microplaque après l'ajout de MASPAT Indicator Red Cells peut produire de faux résultats positifs dans tous les tests (y compris le contrôle négatif). De fausses réactions positives peuvent également résulter d'une remise en suspension incorrecte des MASPAT Indicator Red Cells.
Une centrifugation excessive de la microplaque après l'ajout de MASPAT Indicator Red Cells peut produire de faux résultats négatifs dans tous les tests (y compris le contrôle positif).

Références

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).

Nous garantissons que les produits Sanquin produiront les résultats décrits dans le mode d'emploi du fabricant original. Il est essentiel de respecter rigoureusement les procédures et les schémas d'essai et d'utiliser les réactifs et le matériel recommandés. Sanquin n'acceptera aucune responsabilité relativement au non-respect de ces indications.