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 (el)

Μόνο για επαγγελματική χρήση

Μεθοδολογία στερεάς φάσης για την ανίχνευση αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων

Γενικές πληροφορίες

Το κιτ MASPAT(Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) περιέχει επικαλυμμένες μικροπλάκες MASPAT (12 σειρές με 8 κοιλότητες η καθεμιά), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control and MASPAT negative control. Το κιτ MASPAT ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των σχετικών προτύπων και οδηγιών. Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων αναφέρονται στο έντυπο κυκλοφορίας, το οποίο παρέχεται με το προϊόν εφόσον ζητηθεί. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η τεχνική στερεής φάσης, η οποία βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος. Μια μονοστιβάδα αιμοπεταλίων του δότη ακινητοποιείται μέσω φυγοκέντρησης πάνω στην επιφάνεια των κοιλοτήτων της μικροπλάκας, που είναι επικαλυμμένη με ειδικά για τα αιμοπετάλια μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού. Ο ορός του ασθενούς και το LISS (Low Ionic Strength Solution) επωάζονται στις κατάλληλες κοιλότητες, επιτρέποντας στα αντισώματα του ορού να δεσμευτούν με την ακινητοποιημένη μονοστιβάδα αιμοπεταλίων. Μετά από την επώαση, τα μη δεσμευμένα συστατικά του ορού αφαιρούνται με έκπλυση. Τα αντισώματα που είναι δεσμευμένα με αιμοπετάλια ανιχνεύονται μέσω προσθήκης μονοκλωνικής αντί-ανθρώπινης IgG και ερυθροκυττάρων ευαισθητοποιημένων με ανθρώπινη IgG (MASPAT Indicator Red Cells) και μετέπειτα φυγοκέντρησης της μικροπλάκας. Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης, η αντι-ανθρώπινη IgG και τα MASPAT Indicator Red Cells δεσμεύονται με τα αντισώματα IgG στη μονοστιβάδα αιμοπεταλίων. Οι θετικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται έτσι μέσω της προσκόλλησης των MASPAT Indicator Red Cells ων σε όλη την επιφάνεια των κοιλοτήτων, ενώ οι αρνητικές αντιδράσεις παράγουν ευδιάκριτα σφαιρίδια MASPAT Indicator Red Cells στα μέσα της κοιλότητας. Συνιστάται ιδιαίτερα να συμπεριλαμβάνεται ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας MASPAT σε κάθε σειρά εξετάσεων.

Μέρη του κιτ:

MASPAT Microplate (REF K1366): μια μικροπλάκα με πυθμένα σχήματος U που αποτελείται από 12 σειρές με 8 κοιλότητες η καθεμία. Όλες οι κοιλότητες είναι επικαλυμμένες με ειδικά για τα αιμοπετάλια μονοκλωνικά αντισώματα. Αποθηκεύστε στους 2–8°C. Η μικροπλάκα MASPAT είναι σφραγισμένη σε κενό αέρος μέσα σε πλαστικό σακουλάκι που περιέχει συσκευή ξήρανσης. Μετά την αφαίρεσή τους από το σακουλάκι, οι κοιλότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσα σε τέσσερις εβδομάδες, αν αποθηκευθούν στους 2–8°C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362): Διάλυμα Χαμηλής Ιοντικής Ισχύος.
Αποθήκευση σε 2–8°C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363): περιέχει αντισώματα ειδικά για τα αιμοπετάλια.
Αποθήκευση σε 2–8°C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364): δεν περιέχει αντισώματα ειδικά για αιμοπετάλια.
Αποθήκευση σε 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 mL (REF K1361): μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού ειδικό για ανθρώπινη IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Αποθήκευση σε 2–8°C.

Προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση μόνον. Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2–8°C. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται φιαλίδια με διαρροή ή κατεστραμμένα. Τα αντιδραστήρια (είτε έχουν ανοιχτεί ή είτε όχι) δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης, η οποία είναι τυπωμένη στην ετικέτα του φιαλιδίου. NaN_3 0,1% (w/v) χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Παρότι όλα τα προϊόντα αίματος έχουν ελεγχθεί και έχουν βρεθεί να είναι αρνητικές σε μολυσματικές ασθένειες, τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να θεωρούνται ελεύθερα μολυσματικών παραγόντων.
Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση και απόρριψη καθενός δοχείου και του περιεχομένου του. Η θολότητα ενδέχεται να υποδεικνύει μικροβιακή μόλυνση. Για να αναγνωρίσετε υποβάθμιση του αντιδραστηρίου, συνιστάται ο έλεγχος του αντιδραστηρίου ως μέρος του προγράμματος ποιοτικού ελέγχου χρησιμοποιώντας τους καταλλήλους μάρτυρες. Η απόρριψη των λυμάτων, μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου, πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με τους εργαστηριακούς κανονισμούς.

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Τα **δείγματα ορού** πρέπει να λαμβάνονται από αίμα που έχει υποστεί θρόμβωση μετά από φυγοκέντρηση στα 1500 rcf επί 10 λεπτά. Αν ο έλεγχος του ορού καθυστερεί, πρέπει να αποθηκεύεται στους <–18°C.
Τα Συμπυκνώματα Αιμοπεταλίων (PC) ή το Πλάσμα Υψηλής Περιεκτικότητας σε Αιμοπετάλια (PRP) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εξέταση. Για την προετοιμασία του PRP, συνολικό αίμα που συλλέχθηκε σε EDTA υπόκειται σε φυγοκέντρηση στα 400 rcf επί 10 λεπτά. Το κλάσμα PRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα, μη αραιωμένο.

Διαδικασία εξέτασης

Υλικά που απαιτούνται, αλλά δεν παρέχονται:

- MASPAT Indicator Red Cells 0,3% (REF K1139) ευαισθητοποιημένων ερυθροκυττάρων σε μέσο συντήρησης.

- Πολυκαναλική πιπέττα κατάλληλη για 50, 100 και 150 μL και αναλώσιμα άκρα.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού φωσφορικών αλάτων (PBS) και Tween 20.
- Αποθέματα πολυκαναλικών πιπεττών.
- Αναλώσιμες ΠΛΑΣΤΙΚΕΣ πιπέττες μεταφοράς.
- Φυγόκεντρος κατάλληλη για μικροπλάκες.
- Επωαστής στους 37°C.
- Αναδευτής μικροπλακών.

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (18–25°C).

1. Αφαιρέστε τη μικροπλάκα MASPAT με τον απαιτούμενο αριθμό κοιλοτήτων μικροπλάκας από το σακουλάκι. Οι κοιλότητες που δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν μπορούν να αποθηκευτούν στο πλαστικό σακουλάκι με τη συσκευή ξήρανσης.
2. Προσθέστε 1 σταγόνα (50 μL) PRP ή PC δότη με **πλαστική** πιπέττα μεταφοράς στις απαιτούμενες κοιλότητες (για ορό ασθενούς, MASPAT positive control, MASPAT negative control). Συνιστάται να εκτελείται τον MASPAT positive control, MASPAT negative control) για κάθε σειρά των 8 κοιλοτήτων.
3. Φυγοκεντρήστε την μικροπλάκα επί 5 λεπτά στα 50 rcf για να ακινητοποιήσετε τα αιμοπετάλια στην επιφάνεια των κοιλοτήτων της μικροπλάκας **(χωρίς διακοπή)**.
4. Στραγγίξτε και αφαιρέστε όλα τα μη δεσμευμένα αιμοπετάλια ξεπλένοντας τις κοιλότητες της μικροπλάκας χειροκίνητα 3* φορές με 150 μL PBS/Tween 0,005%. Το διάλυμα έκπλυσης πρέπει να προστίθεται σταγόνα-σταγόνα χρησιμοποιώντας πολυκαναλική πιπέττα. Στραγγίξτε το PBS/Tween μεταξύ των εκπλύσεων γυρίζοντας και χτυπώντας ελαφρά τη μικροπλάκα.
5. Προσθέστε 2 σταγόνες (100 μL) MASPAT LISS σε κάθε κοιλότητα. Το LISS έχει πορφυρό χρώμα.
6. Προσθέστε 1 σταγόνα (50 μL) MASPAT positive- ή negative control στις κατάλληλες κοιλότητες.
7. Προσθέστε 1 σταγόνα (50 μL) ορό ασθενούς στις υπόλοιπες κοιλότητες που περιέχουν μονοστιβάδες αιμοπεταλίων δότη.
8. Αναδεύστε στον αναδευτή μικροπλακών επί 10 δευτερόλεπτα στα 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). Το πορφυρό χρώμα του LISS πρέπει να μετατραπεί σε μπλε.
9. Επωάστε την μικροπλάκα στους 37°C επί 30 λεπτά (σφραγίστε την μικροπλάκα κατά τη διάρκεια της επώασης).
10. Στραγγίξτε και Ξεπλύνετε τις κοιλότητες της μικροπλάκας χειροκίνητα 5* φορές με 150 μl PBS/Tween, όπως στο βήμα 4.
11. Προσθέστε 1 σταγόνα (50 μL) αντιδραστηρίου MASPAT anti-IgG σε κάθε κοιλότητα αμέσως μετά από την έκπλυση.
12. Προσθέστε 1 σταγόνα (50 μL) MASPAT Indicator Red Cells σε κάθε κοιλότητα. Ανακινήστε απαλά.
13. Φυγοκεντρήστε την μικροπλάκα στα 200 rcf επί 5 λεπτά **(χωρίς διακοπή)**.
14. Μπορείτε τώρα να επιθεωρήσετε τις αντιδράσεις είτε μακροσκοπικώς ή χρησιμοποιώντας κάποια αυτόματη συσκευή μέτρησης.

*Αν η έκπλυση γίνεται αυτόματα, συνιστάται να επιβεβαιώνετε τα βήματα έκπλυσης.

Ερμηνεία

Μια θετική ή ασθενής θετική αντίδραση (τα ερυθροκύτταρα δημιουργούν ένα στρώμα που καλύπτει τον πυθμένα της κοιλότητας) φανερώνει την παρουσία αιμοπεταλίων ή/και αντισωμάτων ειδικών για HLA στον ορό.

Μια αρνητική αντίδραση (τα ερυθροκύτταρα δημιουργούν ένα σφαιρίδιο στον πυθμένα της κοιλότητας) φανερώνει την απουσία αιμοπεταλίων ή/και αντισωμάτων ειδικών για HLA στον ορό.

θετική

ασθενής θετική

αρνητική

Ο MASPAT negative control πρέπει να εκτελείται για τον εντοπισμό αυτό-αντισωμάτων δεσμευμένων με τα αιμοπετάλια του δότη.

Αν χρειαστεί να πραγματοποιηθεί αυτοέλεγχος ενός ασθενούς, ο ορός του ασθενούς πρέπει να ελεγχθεί σε σχέση με τα αιμοπετάλια των ασθενών που προέρχονται από δείγμα αίματος EDTA.

Αύξηση της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων: καταψύχοντας τα αιμοπετάλια του δότη (PC ή PRP) για 30 λεπτά το ελάχιστο (<–18°C) θα αυξήσει την αντιδραστικότητά τους. Μετά την κατάψυξη, τα αιμοπετάλια μπορούν να διατηρηθούν για έως και 8 εβδομάδες.

Τα PC μπορούν να αραιωθούν με ρυθμιστικό διάλυμα απολύμανσης.

Σύνθεση διαλύματος στοκ ρυθμιστικού διαλύματος απολύμανσης (10x συμπυκνωμένο):

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

Αραιωμένο σε απιονισμένο νερό

pH: 6,8 – 7,0

Το διάλυμα απολύμανσης 10x συμπυκνωμένο πρέπει να αραιώνεται σε αναλογία 1:10 σε απιονισμένο νερό, πριν από τη χρήση.

Αποθηκεύστε σε θερμοκρασία δωματίου (18–25°C). Διάρκεια ζωής διαλύματος στοκ: 1 έτος. Διάλυμα εργασίας: 1 εβδομάδα.

Περιορισμοί

Το διάλυμα έκπλυσης πρέπει να προστίθεται αργά, καθώς η ορμητική έκπλυση μπορεί να προκαλέσει αφαίρεση τόσο των δεσμευμένων όσο και των μη δεσμευμένων αιμοπεταλίων. Η επιφάνεια της κοιλότητας πρέπει να είναι αδιαφανής, όταν η διαδικασία έκπλυσης έχει εκτελεστεί σωστά. Μη κανονικές "τρύπες" στη μονοστιβάδα του αιμοπεταλίου φανερώνουν λανθασμένη διαδικασία έκπλυσης. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να γίνει μια νέα μονοστιβάδα, χρησιμοποιώντας καινούριες κοιλότητες μικροπλάκας (βήματα 3–5).

Ενδέχεται να υπάρξουν ψευδή θετικά ή ψευδή αρνητικά αποτελέσματα από μόλυνση των υλικών εξέτασης ή οποιαδήποτε απόκλιση από την συνιστώμενη τεχνική.

Ψευδή θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν, αν τα αιμοπετάλια του δότη/ασθενούς είναι μη συμβατά με ABO με τον ορό που εξετάζετε, αν τα αυτό-αντισώματα IgG είναι δεσμευμένα με τα αιμοπετάλια του δότη ή αν η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων είναι πολύ χαμηλή (<0,5 x 10^8/mL). Για να ελέγξετε εάν τα αιμοπετάλια του δότη φέρουν αυτο-αντισώματα, μπορείτε να εκτελέσετε την εξέταση με τα αιμοπετάλια του δότη + τον αρνητικό μάρτυρα ή με τα αιμοπετάλια του δότη + τον ορό του δότη.

Ψευδή αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν με τον θετικό μάρτυρα MASPAT, όταν τα αιμοπετάλια που χρησιμοποιήθηκαν δεν διαθέτουν τα αντιγόνα

HPA-1a και HPA-3a.

Αν η ταχύτητα και ο χρόνος της φυγοκέντρησης δεν έχουν βελτιστοποιηθεί, ενδέχεται να προκύψει κακή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στη μικροπλάκα. Η μη βέλτιστη επικάλυψη των κοιλοτήτων έχει σαν αποτέλεσμα κακή απόδοση της εξέτασης, λόγω της μείωσης της ευαισθησίας και της ισχύος των αντιδράσεων στα αποτελέσματα της τελικής εξέτασης.
Η ανεπαρκής έκπλυση πριν από την προσθήκη αντιδραστηρίου MASPAT anti-IgG ή/και MASPAT Indicator Red Cells ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδείς αρνητικές αντιδράσεις.
Η ελλιπής φυγοκέντρηση της μικροπλάκας μετά από την προσθήκη των MASPAT Indicator Red Cells μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή θετικά αποτελέσματα σε όλες τις εξετάσεις (συμπεριλαμβανομένης και αυτής του αρνητικού μάρτυρα). Οι ψευδείς θετικές αντιδράσεις ενδέχεται επίσης να είναι το αποτέλεσμα της αποτυχημένης επαναιώρησης των MASPAT Indicator Red Cells .
Η υπερβολική φυγοκέντρηση της μικροπλάκας μετά από την προσθήκη των MASPAT Indicator Red Cells μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αρνητικά αποτελέσματα σε όλες τις εξετάσεις (συμπεριλαμβανομένης και αυτής του θετικού μάρτυρα).

Βιβλιογραφία

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).

Τα προϊόντα Sanquin είναι εγγυημένα να αποδίδουν όπως περιγράφεται στις αρχικές οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή. Η αυστηρή συμμόρφωση με τις διαδικασίες, τις διατάξεις δοκιμών και τα συνιστώμενα αντιδραστήρια και εξοπλισμό είναι ουσιώδης. Η Sanquin αποποιείται κάθε ευθύνη που οφείλεται σε τυχόν παρέκκλιση από τα παραπάνω.