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 (it)

Solo per uso professionale

Saggio in fase solida per la rivelazione di anticorpi diretti contro le piastrine

Informazioni generali
Il kit MASPAT (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) contiene micropiastre MASPAT rivestite (12 strisce di 8 pozzetti), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control e MASPAT negative control.
Il kit MASPAT soddisfa i requisiti delle normative e disposizioni vigenti. Le caratteristiche funzionali sono descritte nel documento di rilascio fornito su richiesta a corredo del prodotto. Il principio del test è la tecnica in fase solida, basata sulla reazione antigene/anticorpo. Un monostrato di piastrine del donatore è immobilizzato, per mezzo di centrifugazione, sulla superficie di pozzetti della micropiastra, rivestiti con anticorpi monoclonali murini specifici per le piastrine. Il siero del paziente e la soluzione LISS (Low Ionic Strength Solution – Soluzione a bassa forza ionica) sono incubati nei pozzetti appropriati, permettendo agli anticorpi del siero di legarsi al monostrato di piastrine immobilizzate. Dopo l'incubazione, i componenti del siero non legati sono lavati via. Gli anticorpi legati alle piastrine sono rivelati con l'aggiunta di anticorpi monoclonali murini anti IgG umane e di eritrociti umani sensibilizzati con IgG (MASPAT Indicator Red Cells) e successiva centrifugazione della micropiastra. In caso di reazione positiva, gli anticorpi anti IgG umane e gli MASPAT Indicator Red Cells si legano agli anticorpi IgG presenti sul monostrato di piastrine. Le reazioni positive sono caratterizzate dall'aderenza di MASPAT Indicator Red Cells su tutta la superficie dei pozzetti, mentre le reazioni negative producono un distinto pellet di MASPAT Indicator Red Cells al centro del pozzetto. Si raccomanda vivamente l'inclusione di MASPAT positive control and MASPAT negative control in ogni serie di test.

Componenti del kit:

MASPAT Microplate (REF K1366): micropiastra con pozzetti a fondo ad U costituita da 12 strisce di 8 pozzetti ognuna. Tutti i pozzetti sono rivestiti con anticorpi monoclonali specifici per le piastrine. Conservare
a 2–8°C. La micropiastra MASPAT è sigillata sotto vuoto in un involucro di plastica contenente una sostanza essiccante. Dopo aver rimosso la piastra dall'involucro i pozzetti possono essere utilizzati fino a 4 settimane se conservati a 2–8°C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362): Soluzione a bassa forza ionica.
Conservare a 2–8°C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363): contiene anticorpi specifici per le piastrine.
Conservare a 2–8°C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364): non contiene anticorpi specifici per le piastrine.
Conservare a 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 mL (REF K1361): anticorpo monoclonale murino specifico per le IgG umane (IgG1, IgG2, IgG3). Conservare a 2–8°C.

Avvertenze
Unicamente per uso diagnostico in vitro. Conservare i reagenti a temperature comprese tra 2–8°C. Non utilizzare flaconcini danneggiati o non sigillati. Non utilizzare i reagenti (aperti o non aperti) oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta del flaconcino. Come conservante è utilizzata la NaN_3 0,1% (w/v). Sebbene tutti i prodotti ematici siano analizzati per le malattie infettive, il reagente non può essere considerato esente da agenti infettivi.
Prestare la massima cura nell'utilizzo e nello smaltimento di ciascun flacone e del rispettivo contenuto. La torbidità può essere un indice di contaminazione microbica. Per individuare il deterioramento del reagente, si raccomanda di sottoporlo a test nell'ambito del programma di controllo di qualità del laboratorio mediante controlli appropriati. Lo smaltimento dei rifiuti, al termine del test, dovrà essere eseguito nel rispetto delle normative interne di laboratorio.

Raccolta e preparazione dei campioni
I campioni di siero devono essere ottenuti da sangue coagulato per mezzo di centrifugazione a 1500 rcf per 10 minuti.
In caso di rinvio dell'analisi del siero, la conservazione dovrà avere luogo ad una temperatura inferiore a <-18°C.
Nel test possono essere utilizzati concentrati di piastrine (Platelet Concentrates - PC) o plasma arricchito di piastrine (Platelet Rich Plasma - PRP). Per la preparazione del PRP, il sangue intero raccolto in EDTA è centrifugato a 400 rcf per 10 minuti. La frazione PRP può essere utilizzata direttamente, non diluita.

Metodiche
Materiali richiesti ma non forniti:
- Sospensione allo 0,3% di MASPAT Indicator Red Cells (REF K1139) composta da eritrociti sensibilizzati in terreno di conservazione.
- Pipetta multicanale in grado di dispensare 50, 100 e 150 µL e puntali monouso.
- Tampone fosfato isotonico (PBS) e Tween 20.

- Serbatoi per la pipetta multicanale.
- Pipette di plastica monouso.
- Centrifuga per micropiastre.
- Incubatore a 37°C.
- Agitatore per micropiastre.

Portare i reagenti a temperatura ambiente (18–25°C).

1. Rimuovere dall'involucro la micropiastra MASPAT con il numero di strisce desiderato. I pozzetti non utilizzati possono essere conservati nell'involucro di plastica con la sostanza essiccante.
2. Aggiungere 1 goccia (50 µL) di PRP o PC del donatore ai pozzetti necessari per il siero del paziente, il MASPAT positive control, MASPAT negative control) utilizzando una pipetta di **plastica**. Si consiglia di effettuare il MASPAT positive- e MASPAT negative control per ciascuna lamella di 8 pozzetti.
3. Centrifugare la micropiastra per 5 minuti a 50 rcf per immobilizzare le piastrine sulla superficie dei pozzetti **(senza frenare)**.
4. Decantare e rimuovere ogni piastrina non legata lavando manualmente i pozzetti della micropiastra 3* volte con 150 µL di PBS/Tween 0,005%. Aggiungere la soluzione di lavaggio goccia a goccia utilizzando una pipetta multicanale. Decantare il PBS/Tween tra un lavaggio e l'altro invertendo e scuotendo la micropiastra.
5. Aggiungere 2 gocce (100 µL) di soluzione MASPAT LISS ad ogni pozzetto. La soluzione LISS è di colore porpora.
6. Aggiungere 1 goccia (50 µL) di MASPAT positive- o negative control ai pozzetti appropriati.
7. Aggiungere (50 µL) di siero del paziente ai restanti pozzetti contenenti i monostrati di piastrine del donatore.
8. Agitare su un agitatore per micropiastra per 10 secondi a 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). Il colore porpora della soluzione LISS deve virare al blu.
9. Incubare la micropiastra a 37°C per 30 minuti (durante l'incubazione sigillare la micropiastra).
10. Decantare e lavare manualmente i pozzetti della micropiastra 5* volte con 150 µL di PBS/Tween, come riportato al punto 4.
11. Immediatamente dopo i lavaggi, aggiungere 1 goccia (50 µL) di reagente MASPAT anti-IgG ad ogni pozzetto.
12. Aggiungere 1 goccia (50 µL) di MASPAT Indicator Red Cells ad ogni pozzetto. Agitare delicatamente.
13. Centrifugare la micropiastra a 200 rcf per 5 minuti **(senza frenare)**.
14. A questo punto le reazioni possono essere lette macroscopicamente o mediante un lettore automatico.
    *Se il lavaggio è effettuato automaticamente, si consiglia di confermare i passaggi dei lavaggi.

Interpretazione

Una reazione positiva o debolmente positiva (gli eritrociti formano uno strato sul fondo del pozzetto) indica la presenza di piastrine e/o di anticorpi HLA-specifici nel siero.
Una reazione negativa o debolmente positiva (gli eritrociti formano un bottone sul fondo del pozzetto) indica l'assenza di piastrine e/o di anticorpi HLA-specifici nel siero.

Positive

debolmente positiva

negativa

Il MASPAT negative control deve essere effettuato per determinare l'eventuale presenza di autoanticorpi legati alle piastrine del donatore.
Se è richiesto un autocontrollo, il siero del paziente deve essere analizzato contro le piastrine proprie del paziente stesso e derivanti da un campione di sangue raccolto in EDTA.

Aumento della reattività delle piastrine: congelando le piastrine del donatore (PC o PRP) per un minimo di 30 minuti (<-18°C) si ottiene un aumento della loro reattività. Dopo il congelamento, le piastrine possono essere conservate per un massimo di 8 settimane.

I PC possono essere diluiti con il tampone sequestrine.
Composizione della soluzione madre del tampone sequestrine (concentrazione 10X)

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

Disciolti in acqua
pH: 6,8 - 7,0
Il tampone sequestrine 10x deve essere diluito 1:10 in acqua prima dell'uso.
Conservare a temperatura ambiente (18–25°C). Periodo di validità della soluzione madre: 1 anno; periodo di validità della soluzione diluita: 1 settimana.

Limitazioni

Aggiungere la soluzione di lavaggio lentamente in quanto lavaggi troppo vigorosi possono rimuovere sia le piastrine legate che quelle non legate. Se la procedura di lavaggio è stata effettuata correttamente, la superficie del pozzetto deve apparire opaca. "Buchi" irregolari nel monostrato di piastrine indicano che la procedura di lavaggio è stata svolta in modo errato. Se ciò si verifica, è necessario caricare un nuovo monostrato di piastrine utilizzando nuovi pozzetti della micropiastra (punti 3–5).
Risultati falsi positivi o falsi negativi possono essere dovuti alla contaminazione dei materiali impiegati per il test o a qualunque deviazione rispetto alla tecnica raccomandata.
Risultati falsi positivi si possono verificare se le piastrine del donatore/paziente sono ABO incompatibili con il siero testato, se alle piastrine sono legati autoanticorpi IgG o se la concentrazione delle piastrine è troppo bassa
($<0,5 \times 10^8$/mL). Per controllare se le piastrine del donatore recano autoanticorpi, effettuare la prova con piastrine del donatore + negative control o con piastrine del donatore + siero del donatore.
Risultati falsi negativi si possono verificare con il MASPAT positiv control quando le piastrine utilizzate sono prive degli antigeni HPA-1a e HPA-3a.
Se la velocità ed il tempo di centrifugazione non sono stati ottimizzati, può verificarsi una scarsa adesione delle piastrine alla micropiastra. Un coating poco ottimale dei pozzetti comporterà uno svolgimento del test non adeguato riducendo sia la sensibilità che la forza delle reazioni nei risultati finali del test.

Lavaggi non efficaci prima dell'aggiunta del reagenti MASPAT anti-IgG e/o degli MASPAT Indicator Red Cells può indurre la comparsa di falsi negativi.
L'ultracentrifugazione della micropiastra dopo l'aggiunta degli MASPAT Indicator Red Cells può indurre la comparsa di falsi positivi in tutti i test (incluso il controllo negativo). Falsi positivi possono derivare anche da una risospensione errata degli MASPAT Indicator Red Cells.
Una sovracentrifugazione della micropiastra dopo l'aggiunta degli MASPAT Indicator Red Cells può indurre la comparsa di falsi negativi in tutti i test (incluso il controllo positivo).

Bibliografia

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).

Si garantisce che i prodotti Sanquin daranno i risultati indicati nelle istruzioni d'uso del fabbricante originario. È essenziale attenersi rigorosamente a queste indicazioni circa le procedure e layout di prova e utilizzare i reagenti e le apparecchiature raccomandate. Sanquin declina ogni responsabilità per eventuali conseguenze derivanti dalla mancata osservanza di queste norme.