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 (pl)

Wyłącznie do użytku profesjonalnego

Oznaczenie oparte na technice stałej fazy do wykrywania przeciwciał przeciwpłytkowych

Informacje ogólne
Zestaw MASPAT (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) zawiera pokryte przeciwciałami (12 pasków po 8 dołków) mikropłytki MASPAT, odczynnik MASPAT LISS, przeciwciało MASPAT anty-IgG, MASPAT positive control oraz MASPAT negative control. Zestaw MASPAT spełnia wymagania odpowiednich norm i wytycznych. Charakterystyki działania są opisane w dokumencie dopuszczenia do obrotu, który na prośbę klienta może być dostarczony wraz z produktem. Zasada testu jest oparta na technice stałej fazy, która polega na reakcji antygen/przeciwciało. Pojedyncza warstwa płytek krwi dawcy wskutek wirowania zostaje unieruchomiona na powierzchni dołków mikropłytki, pokrytych swoistymi dla płytek krwi, monoklonalnymi przeciwciałami mysimi. Surowicę pacjenta wraz z roztworem o małej sile jonowej LISS (Low Ionic Strength Solution) inkubuje się w odpowiednich dołkach, umożliwiając związanie się przeciwciał z surowicy z pojedynczą warstwą unieruchomionych płytek krwi. Po inkubacji niezwiązane składniki surowicy usuwa się przez wypłukiwanie. Związane z płytkami krwi przeciwciała wykrywa się poprzez dodanie monoklonalnych przeciwciał mysich przeciwko ludzkiej IgG oraz ludzkich erytrocytów uczulonych IgG (MASPAT Indicator Red Cells), a następnie odwirowanie mikropłytki. W przypadku reakcji dodatniej przeciwciała przeciwko ludzkiej IgG oraz krwinki MASPAT Indicator Red Cells wiążą się z przeciwciałami IgG na powierzchni warstwy płytek krwi. Zatem reakcje dodatnie charakteryzują się przywieraniem wskaźnikowych krwinek czerwonych do całej powierzchni dołków, podczas gdy w wyniku reakcji ujemnych powstają drobne skupiska krwinek z zawiesiny MASPAT Indicator Red Cells w środkowej części dołka. Zdecydowanie zaleca się zastosowanie w każdej serii testów MASPAT positive control oraz MASPAT negative control
Elementy zestawu:

MASPAT Microplate (REF K1366): mikropłytka zawierająca 12 pasków po 8 dołków o zaokrąglonym dnie (w kształcie litery U). Wszystkie dołki zostały opłaszczone monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi swoiście przeciwko płytkom krwi . Przechowywać w temperaturze 2-8°C. Mikropłytka MASPAT jest pakowana próżniowo w plastikowe opakowanie, zawierające pochłaniacz wilgoci. Po wyjęciu płytki z opakowania dołki nadają się do użycia przez 4 tygodnie, pod warunkiem przechowywania płytki w temperaturze 2-8°C.

MASPAT LISS 10 ml (REF K1362): roztwór o małej sile jonowej (Low Ionic Strength Solution). Przechowywać w temperaturze 2-8°C.

MASPAT positive control 1 ml (REF K1363): zawiera przeciwciała skierowane swoiście przeciwko płytkom krwi. Przechowywać w temperaturze 2-8°C.

MASPAT negative control 1 ml (REF K1364): nie zawiera przeciwciał skierowanych swoiście przeciwko płytkom krwi. Przechowywać w temperaturze 2-8°C.

MASPAT anti-IgG 6 ml (REF K1361): monoklonalne przeciwciało mysie), skierowane swoiście przeciwko ludzkiej IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Przechowywać w temperaturze 2-8°C.

Środki ostrożności
Stosować jedynie w diagnostyce in vitro. Odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie wolno używać fiolek uszkodzonych ani przeciekających. Nie wolno używać odczynników (ani nieotwartych, ani otwartych) po upływie terminu ważności, który jest wydrukowany na etykiecie fiolki. Środkiem konserwującym jest 0,1% NaN_3 (stężenie wagowe). Chociaż wszystkie produkty krwiopochodne są badane w kierunku chorób zakaźnych, a wyniki tych badań są ujemne, nie można jednak zakładać, że odczynniki nie zawierają czynników zakaźnych. Należy zachować szczególną ostrożność podczas stosowania produktu i usuwania jego pozostałości oraz opakowań po produkcie. Zmętnienie może wskazywać na skażenie bakteryjne. W celu sprawdzenia jakości odczynnika zaleca się jego przetestowanie w ramach laboratoryjnego programu kontroli jakości, z zastosowaniem odpowiednich metod kontrolnych. Po zakończeniu testu wszelkie pozostałości niewykorzystanego produktu należy usunąć w sposób zgodny z przepisami laboratorium, w którym test przeprowadzano.

Pobieranie i przygotowywanie materiału
Próbki surowicy uzyskuje się z wykrzepionej krwi po jej odwirowaniu z przyspieszeniem 1500 RCF przez 10 minut. Jeżeli badanie próbek surowicy będzie wykonane z opóźnieniem, próbki należy przechowywać w temperaturze niższej niż <–18°C. W teście można wykorzystać koncentrat płytkowy lub osocze bogatopłytkowe. W celu przygotowania osocza bogatopłytkowego odwirowuje się krew pełną pobraną na EDTA z przyspieszeniem 400 RCF przez 10 minut. Frakcję osocza bogatopłytkowego można stosować bezpośrednio, bez rozcieńczania.

Procedura testu
Materiały wymagane, lecz niedostarczane:
- 0,3% zawiesina MASPAT Indicator Red Cells (REF K1139), zawierająca uczulone erytrocyty w podłożu konserwującym.
- Pipeta wielokanałowa z możliwością podawania objętości: 50, 100 i 150 µl oraz jednorazowe końcówki.
- Roztwór soli buforowany buforem fosforanowym (PBS, Phosphate Buffered Saline) oraz Tween 20.
- Zbiorniki do pipety wielokanałowej.

- Jednorazowe pipety PLASTIKOWE do przenoszenia próbek.
- Wirówka odpowiednia do odwirowywania mikropłytek.
- Inkubator o temperaturze 37°C.
- Wytrząsarka do mikropłytek.

Należy odczekać, aż wszystkie odczynniki osiągną temperaturę pokojową (18-25°C).

1. Wyjąć z opakowania mikropłytkę z wymaganą liczbą dołków. Nieużywane dołki można przechowywać w plastikowym opakowaniu z pochłaniaczem wilgoci.
2. **Plastikową** pipetą do przenoszenia próbek dodać 1 kroplę (50 µl) osocza bogatopłytkowego lub koncentratu płytkowego dawcy do wymaganych dołków (przeznaczonych na surowicę pacjenta, MASPAT positive control, MASPAT negative control). Zaleca się wykonanie MASPAT POSITIVE- i MASPAT NEGATIVE CONTROL dla każdego z rzędów po 8 dołków.
3. Wirować mikropłytkę przez 5 minut z przyspieszeniem 50 RCF, aby unieruchomić płytki krwi na powierzchni dołków mikropłytki **(bez hamowania)**.
4. Odcedzić i usunąć wszelkie niezwiązane płytki krwi poprzez ręczne przepłukanie dołków mikropłytki 3* razy za pomocą 150 µl mieszaniny PBS/0,005% Tween. Roztwór płuczący powinno się dodawać kroplami za pomocą pipety wielokanałowej. Odcedzić PBS/Tween pomiędzy powtórkami płukania, odwracając i potrząsając płytką.
5. Dodać 2 krople (100 µl) odczynnika MASPAT LISS do każdego dołka. Odczynnik LISS ma purpurowy kolor.
6. Dodać 1 kroplę (50 µl) MASPAT positive lub negative control do odpowiednich dołków.
7. Dodać 1 kroplę (50 µl) surowicy pacjenta do pozostałych dołków zawierających warstwę płytek krwi dawcy.
8. Wytrząsać mikropłytkę na wytrząsarce (Sarstedt, TPM-2) z prędkością 800 obr./min przez 10 sekund. Purpurowy kolor odczynnika LISS powinien zmienić się na niebieski.
9. Inkubować mikropłytkę w temperaturze 37°C przez 30 minut (zamknąć mikropłytkę na czas inkubacji).
10. Odcedzić i ręcznie przepłukać dołki mikropłytki 5* razy za pomocą 150 µl mieszaniny PBS/Tween (zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 4).
11. Bezpośrednio po przepłukaniu dodać 1 kroplę (50 µl) odczynnika MASPAT anti-IgG do każdego dołka.
12. Dodać 1 kroplę (50 µl) zawiesiny MASPAT Indicator Red Cells do każdego dołka. Delikatnie wstrząsnąć.
13. Wirować mikropłytkę z przyspieszeniem 200 RCF przez 5 minut **(bez hamowania)**.
14. Wówczas można odczytać wyniki reakcji, zarówno makroskopowo, jak i za pomocą automatycznego czytnika.

    * Jeżeli płukanie wykonuje się automatycznie, zaleca się przeprowadzenie walidacji etapów płukania.

Interpretacja

Reakcja dodatnia lub słabo dodatnia (erytrocyty tworzą warstwę ponad dnem dołka) wskazuje na obecność w surowicy przeciwciał skierowanych swoiście przeciwko płytkom i/lub antygenom HLA.
Reakcja ujemna (erytrocyty tworzą skupisko na dnie dołka) wskazuje na brak w surowicy przeciwciał skierowanych swoiście przeciwko płytkom i/lub antygenom HLA.

dodatnia

słabo dodatnia

ujemna

MASPAT negative control należy przeprowadzić w celu określenia obecności autoprzeciwciał związanych z płytkami krwi dawcy.
Jeżeli wymagana jest autokontrola pacjenta, wówczas surowicę pacjenta należy zbadać w reakcji z jego własnymi płytkami, pochodzącymi z próbki krwi pobranej na EDTA.

Zwiększanie reaktywności płytek krwi: zamrożenie płytek krwi dawcy (koncentratu płytkowego lub osocza bogatopłytkowego) co najmniej na 30 minut (w temperaturze niższej niż <−18°C) zwiększa ich reaktywność. Po zamrożeniu płytki mogą być przechowywane do 8 tygodni.

Koncentraty płytkowe można rozcieńczać buforem sekwestrującym.
Skład dostępnego roztworu buforu sekwestrującego (stężenie 10-krotne):

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

Rozcieńczony zdemineralizowaną wodą
pH: 6,8-7,0.
Bufor sekwestrujący (stężenie 10-krotne) przed użyciem należy rozcieńczyć wodą zdemineralizowaną w proporcji 1:10.
Przechowywać w temperaturze pokojowej (18-25°C). Okres przechowywania dostępnego roztworu: 1 rok; roztworu roboczego: 1 tydzień.

Ograniczenia

Roztwór do płukania należy dodawać powoli, gdyż zbyt energiczne płukanie może usuwać zarówno związane, jak i niezwiązane płytki krwi. W przypadku prawidłowo przeprowadzonej procedury płukania powierzchnia dołka powinna być nieprzejrzysta. Nieregularne „otwory" w warstwie płytek krwi wskazują na nieprawidłowo przeprowadzoną procedurę płukania. W takim wypadku należy wytworzyć na nowo warstwę płytek krwi, używając nowych dołków mikropłytki (czynności opisane w punktach 3-5).
Wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne mogą mieć miejsce w rezultacie skażenia badanych materiałów lub innych odchyleń od zalecanej techniki. Wyniki fałszywie dodatnie mogą występować, jeżeli płytki krwi dawcy/pacjenta są niezgodne w zakresie grup ABO z badaną surowicą, jeżeli z płytkami krwi dawcy związane są autoprzeciwciała z grupy IgG lub jeżeli koncentracja płytek jest zbyt mała ($<0,5 \times 10^8$/ml). Aby sprawdzić obecność autoprzeciwciał w płytkach krwi dawcy, można przeprowadzić badanie płytek dawcy + kontrolę ujemną lub badanie płytek dawcy + surowicy dawcy.
Wyniki fałszywie ujemne podczas stosowania kontroli dodatniej MASPAT mogą wystąpić, gdy używane płytki krwi nie posiadają antygenów HPA-1a i HPA-3a.
Jeżeli prędkość i czas wirowania nie zostały zoptymalizowane, płytki krwi mogą słabo przywierać do powierzchni mikropłytki.
Niedokładne pokrycie dołków przeciwciałami będzie skutkować niedostatecznym działaniem testu wskutek zmniejszenia zarówno jego czułości, jak i siły reakcji w końcowych wynikach badania.

Niedostateczne przepłukanie przed dodaniem odczynnika MASPAT anti-IgG i/lub zawiesiny MASPAT Indicator Red Cells może powodować reakcje fałszywie ujemne. Zbyt słabe odwirowanie mikropłytki po dodaniu zawiesiny MASPAT Indicator Red Cells może prowadzić do wyników fałszywie dodatnich we wszystkich testach (w tym również z kontrolą ujemną). Reakcje fałszywie dodatnie mogą również być rezultatem nieprawidłowego przebiegu ponownego wytwarzania zawiesiny krwinek MASPAT Indicator Red Cells.
Zbyt silne odwirowanie mikropłytki po dodaniu zawiesiny MASPAT Indicator Red Cells może prowadzić do wyników fałszywie ujemnych we wszystkich testach (w tym również z kontrolą dodatnią).

Literatura

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).

Gwarantujemy działanie produktów Sanquin w sposób opisany w oryginalnej instrukcji obsługi dostarczonej przez producenta. Istotne znaczenie ma ścisłe przestrzeganie procedur, układów testowych i używanie zalecanych odczynników oraz sprzętu. Fundacja Sanquin nie przyjmuje żadnej odpowiedzialności za jakiekolwiek odchylenia od powyższych wymagań.