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 (pt)

Exclusivamente para uso profissional

Ensaio de fase sólida para a detecção de anticorpos plaquetários

Informação geral
O dispositivo MASPAT (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) contém microplacas cobertas (12 tiras para 8 recipientes), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control e negative control. O dispositivo MASPAT preenche os requisitos dos padrões e directrizes aplicáveis. As características de execução encontram-se mencionadas no documento de autorização, que, a pedido, é fornecido com o produto. O princípio do teste é a técnica de fase sólida, que se baseia na reacção antigénio/anticorpo. Imobiliza-se, por centrifugação, uma monocamada de plaquetas do dador, para a superfície dos recipientes da microplaca coberta com anticorpo monoclonal de ratinho específico para plaquetas. O soro do paciente e a LISS (solução de baixo poder iónico) são incubados nos recipientes adequados, permitindo que os anticorpos séricos se liguem à monocamada imobilizada de plaquetas. Os componentes séricos não ligados são removidos por lavagem a seguir à incubação. Os anticorpos ligados às plaquetas são detectados por meio da adição de IgG anti-humana monoclonal de ratinho e de eritrócitos humanos IgG sensibilizados (MASPAT Indicator Red Cells) e subsequente centrifugação da microplaca. No caso de haver uma reacção positiva, o IgG anti-humano e os MASPAT Indicator Red Cells ligam-se aos anticorpos IgG na monocamada plaquetária. As reacções positivas são, por isso, caracterizadas pela aderência dos MASPAT Indicator Red Cells através da superfície dos recipientes, enquanto as reacções negativas produzem bolas discretas de MASPAT Indicator Red Cells no meio do recipiente. Recomenda-se vivamente a inclusão do MASPAT positive control e do MASPAT negative control em cada série de testes.

Componentes do dispositivo:

MASPAT Microplate (REF K1366): uma microplaca com fundo em U consistindo em 12 tiras de 8 recipientes. Todos os recipientes estão cobertos com anticorpos monoclonais específicos das plaquetas. Armazenamento de 2–8ºC. A microplaca MASPAT encontra-se fechada por vácuo numa bolsa de plástico contendo exsicante. Uma vez removida a bolsa, os recipientes podem ser utilizados até um período de 4 semanas, desde que armazenados entre 2–8º C.

MASPAT LISS 10 ml (REF K1362): Solução de baixo poder iónico.
Armazenamento de 2–8ºC.

MASPAT positive control 1 ml (REF K1363): contém anticorpos plaquetários específicos. Armazenamento de2–8ºC.

MASPAT negative control 1 ml (REF K1364): não contém anticorpos plaquetários específicos.
Armazenamento de 2–8ºC.

MASPAT anti-IgG 6 ml (REF K1361): anticorpo monoclonal de ratinho específico para IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3).
Armazenamento de 2–8ºC.

Precauções
Exclusivamente para o diagnóstico in vitro. Os reagentes devem ser armazenados a uma temperatura de 2–8°C. Frascos danificados ou com fugas não devem ser usados. Os reagentes (por abrir ou abertos) não devem ser utilizados para além do prazo de validade impresso no rótulo do frasco. NaN_3 a 0,1% (w/v) é usado como conservante. Apesar de todos os produtos sanguíneos terem sido testados para as doenças infecciosas, e terem sido considerados negativos, os reagentes não podem ser dados como isentos de agentes infecciosos. A manipulação e a destruição de cada recipiente devem ser efectuadas com cuidado. Um aspecto turvo pode ser indiciador de contaminação microbiana. Para detectar a deterioração do reagente, recomenda-se testar o mesmo como fazendo parte do programa do controlo de qualidade do laboratório, usando controlos apropriados. A eliminação de resíduos deve ser tratada de acordo com o regulamento do seu laboratório, depois de completado o teste.

Colheita e preparação das amostras
As amostras de soro devem ser obtidas de sangue coagulado após centrifugação a 1500 rcf durante 10 minutos. Caso haja atraso no teste do soro, o armazenamento deve ser efectuado a <–18°C.
Podem ser utilizados no teste concentrados de plaquetas (CP) ou plasma rico em plaquetas (PRP). Para a preparação de PRP, utilizou-se sangue total colhido para EDTA e centrifugado a 400 rcf durante 10 minutos. A fracção PRP pode ser utilizada directamente, não diluída.

Procedimento do teste
Materiais necessários mas não fornecidos:
- MASPAT Indicator Red Cells com suspensão a 0,3% (REF K1139) de eritrócitos sensibilizados em meio conservante.
- Pipeta multicanais indicada para 50, 100 e 150 µl e pontas descartáveis.
- Fosfato salino tamponado (FST) e Tween 20.
- Recipientes para pipetas multicanais.
- Pipetas descartáveis de PLÁSTICO para a transferência.

- Centrífuga adequada para microplacas.
- Incubadora a 37°C
- Misturadora de microplacas.

Permitir que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18–25ºC).

1. Retirar da bolsa MASPAT a microplaca com o número necessário de recipientes. Os recipientes não usados podem ser guardados na bolsa de plástico com o exsicante.
2. Adicionar 1 gota (50 µl) de PRP ou CP do dador para os recipientes necessários, com uma pipeta transferidora de **plástico** (para o soro do paciente, MASPAT positive control , MASPAT negative control). Aconselha-se a efectuar o MASPAT positive control e MASPAT negative control para cada tira de 8 recipientes.
3. Centrifugar a microplaca durante 5 minutos a 50 rcf para imobilizar as plaquetas à superfície dos recipientes da microplaca **(sem paragens)**.
4. Decantar e remover quaisquer plaquetas não ligadas, lavando os recipientes da microplaca manualmente, 3* vezes, com 150 µl de FST/Tween 0,005%. Adicionar a solução de lavagem gota a gota, usando uma pipeta multicanais. Entre as lavagens, decantar FST/Tween por inversão e leve agitação.
5. Adicionar 2 gotas (100 µl) de MASPAT LISS a cada recipiente. A LISS é de cor púrpura.
6. Adicionar 1 gota (50 µl) de MASPAT positive ou negative control aos recipientes adequados.
7. Adicionar 1 gota (50 µl) de soro do paciente aos restantes recipientes contendo monocamadas de plaquetas do dador.
8. Agitar num misturador de microplacas durante 10 segundos a 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). A cor púrpura da LISS deve mudar para azul.
9. Incubar a microplaca a 37°C durante 30 minutos (selar a microplaca durante a incubação).
10. Decantar e lavar os recipientes da microplaca manualmente, 5* vezes, com 150 µl de FST/Tween, como indicado no ponto 4.
11. Imediatamente após a lavagem, adicionar 1 gota (50 µl) de reagente MASPAT anti-IgG a cada recipiente.
12. Adicionar 1 gota (50 µl) de MASPAT Indicator Red Cells a cada recipiente. Agitar suavemente.
13. Centrifugar a microplaca a 200 rcf durante 5 minutos **(sem paragens)**.
14. As reacções podem agora ser lidas macroscopicamente ou através dum leitor automático.

* Se a lavagem for efectuada automaticamente, aconselha-se a validar os passos de lavagem.

Interpretação

Uma reacção positiva ou positiva fraca (os eritrócitos formam uma camada sobre o fundo do recipiente) indicam a presença de plaquetas e/ou anticorpos HLA específicos no soro.
Uma reacção negativa (os eritrócitos formam um botão no fundo do recipiente) indica a ausência de plaquetas e/ou anticorpos específicos HLA no soro.

positivo fracamente positivo negativo

O MASPAT negative control tem que ser efectuado para determinar auto-anticorpos ligados às plaquetas do dador.
Se for necessário o autocontrolo dum paciente, tem que se testar o soro do paciente contra as plaquetas do próprio paciente derivadas duma amostra de sangue com EDTA.

Reforçar a reactividade de plaquetas: obtém-se um reforço da sua reactividade por refrigeração das plaquetas do dador (CP ou PRP), durante um mínimo de 30 minutos (<-18 C). Após refrigeração, as plaquetas podem ser mantidas por até 8 semanas.

Os CPs podem ser diluídos com tampão sequestrino.
Composição da solução stock de tampão sequestrino (10x concentrada):

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

Dissolvida em metade de água
pH: 6,8 – 7,0
O tampão sequestrino 10x concentrado deve ser diluído numa proporção de 1:10 em metade de água antes da utilização.
Armazenar à temperatura ambiente (18–25ºC). Prazo de armazenamento da solução stock: 1 ano; solução em uso: 1 semana.

Limitações

A solução lavagem deve ser adicionada lentamente, uma vez que uma lavagem vigorosa poderia remover tanto as plaquetas ligadas como as plaquetas não ligadas. A superfície do recipiente deve ser opaca, quando o processo de lavagem tiver sido efectuado adequadamente. A presença de "buracos" irregulares na monocamada plaquetária indica um processo de lavagem incorrecto. Se tal ocorrer, deve ser utilizada uma nova monocamada, usando novos recipientes de microplaca (passos 3–5).
Podem ocorrer falsos resultados positivos, ou negativos, através da contaminação dos materiais de teste, ou de algum desvio da técnica recomendada.
Podem ocorrer falsos resultados positivos se as plaquetas do dador/paciente ABO forem incompatíveis com o soro a ser testado, se os auto-anticorpos IgG estiverem ligados às plaquetas do dador, ou se a concentração das plaquetas for demasiado baixa ($<0,5 \times 10^8$/ml).
Para verificar se estão presentes auto-anticorpos nas plaquetas do dador, pode realizar-se um teste com plaquetas do dador + negative control ou plaquetas do dador + soro do dador.
Podem ocorrer falsos resultados negativos com o MASPAT positive control, se as plaquetas utilizadas forem omissas nos antigénios HPA-1a e HPA-3a.
Se a velocidade e o tempo de centrifugação não tiverem sido optimizados, pode ocorrer uma aderência fraca das plaquetas à microplaca.
Uma cobertura subóptima dos recipientes causará, nos resultados finais do teste, um desempenho inadequado do teste por redução quer da sensibilidade, quer da força das reacções.
Uma lavagem insuficiente antes da adição do reagente MASPAT anti-IgG e/ou dos MASPAT Indicator Red Cells pode originar falsas reacções negativas.

Uma subcentrifugação da microplaca após a adição de MASPAT Indicator Red Cells pode originar falsos resultados positivos em todos os testes (incluindo o controlo negativo). Falsas reacções positivas podem igualmente dever-se à ressuspensão incorrecta dos MASPAT Indicator Red Cells.
Uma hipercentrifugação da microplaca após a adição de MASPAT Indicator Red Cells pode originar falsos resultados negativos em todos os testes (incluindo o controlo 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).

Os produtos Sanquin têm garantia de desempenho conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante original. É essencial uma adesão rigorosa aos procedimentos, configurações de teste, reagentes e equipamento recomendados. A Sanquin declina qualquer responsabilidade em caso de desvio em relação ao acima mencionado.