

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 (cs)

Pouze pro profesionální použití

Technika pevné fáze pro detekci antitrombocytárních protilátek

Všeobecné informace

MASPAT kit (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) obsahuje povlečené **microplate** (12 stripů po 8 jamkách), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control and MASPAT negative control. MASPAT kit splňuje požadavky příslušných standardů a doporučení. Jeho parametry jsou uvedeny v propouštěcích dokumentech, které jsou poskytnuty s produktem na vyžádání. Principem testu je technika pevné fáze, která je založena na reakci antigen/protilátka. Vrstva (monolayer) trombocytů dárce se imobilizuje centrifugací k povrchu jamek mikrodestičky povlečených pro trombocyty specifickou myší monoklonální protilátkou. V příslušných jamkách se inkubuje sérum pacienta v roztoku s nízkou iontovou silou LISS (Low Ionic Strength Solution), čímž se sérové protilátky naváží na imobilizovanou vrstvu trombocytů. Po inkubaci se nenavázané sérové komponenty odstraní promytím. Na trombocyty navázané protilátky se detekují přidáním myší monoklonální protilátky proti lidskému IgG a lidských IgG senzibilizovaných erytrocytů (MASPAT Indicator Red Cells) s následnou centrifugací mikrodestičky.

V případě pozitivní reakce se protilátka proti lidskému IgG a MASPAT Indicator Red Cells naváží na IgG protilátky na vrstvě trombocytů v jamkách. Pozitivní reakce je charakterizována adherencí MASPAT Indicator Red Cells na povrch jamek, zatímco negativní reakce je tvořena malými terčíky MASPAT Indicator Red Cells uprostřed jamky. Doporučuje se použít s každou sérií vzorků MASPAT positive control and MASPAT negative control.

Součásti kitu:

MASPAT Microplate (REF K1366): mikrodestičky s U dnem, které obsahují 12 stripů po 8 jamkách. Všechny jamky jsou povlečené pro trombocyty specifickou monoklonální protilátkou. Uchovávání při 2–8°C. MASPAT mikrodestička je vakuově uzavřena v plastickém sáčku s desikantem. Po vyjmutí ze sáčku může být mikrodestička používána po dobu až 4 týdnů, pokud je uchovávána při 2–8°C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362): roztok o nízké iontové síle.
Uchovávání při 2–8°C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363): obsahuje pro trombocyty specifické monoklonální protilátky. Uchovávání při 2–8°C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364): neobsahuje žádné pro trombocyty specifické protilátky. Uchovávání při 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 ml (REF K1361): myší monoklonální protilátka specifická pro lidské IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Uchovávání při 2–8°C.

Upozornění

Kit je určen pouze pro použití in vitro. Skladuje se při 2–8°C. Tekoucí nebo jinak poškozené lahvičky se nesmí použít. Diagnostika (neotevřená nebo otevřená) se nesmí používat po uplynutí expirační doby, která je uvedena na etiketě lahvičky. Jako konzervační přípravek se používá 0,1% (w/v) azid sodný.

Ačkoliv všechny krevní produkty byly testovány na infekční onemocnění s negativním výsledkem nelze u diagnostika zcela vyloučit přítomnost infekčního agens. Pozornost musí být věnována při užití a nakládání s každým obalem a jeho obsahem. Turbidita může být známkou mikrobiální kontaminace. Aby se rozpoznalo poškození diagnostika, doporučuje se testovat diagnostikum jako součást laboratorního programu kontroly kvality s použitím příslušných kontrol. Odstranění odpadu po provedení testování se provádí v souladu s postupy dané laboratoře.

Odběr a příprava vzorků

Vzorky sér se získávají ze srážlivé krve centrifugací 15 minut při 1500 rcf. Jestliže je testování sér odloženo, uchovávají se při <-18°C. V testu se může použít trombocytární koncentrát (PC) nebo plazma bohatá na trombocyty (PRP). Pro přípravu PRP se plná krev odebírá do EDTA a centrifuguje 10 minut při 400 rcf. PRP frakce může být použita přímo bez ředění.

Postup testu

Požadovaný materiál (nedodávaný):

- MASPAT Indicator Red Cells, 0,3% (REF K1139) senzibilizovaných erytrocytů v konzervačním roztoku.
- Vícekanálová pipeta pro 50, 100 a 150 µL a umělohmotné špičky
- Pufrovaný izotonický roztok chloridu sodného (PBS) a Tween 20
- Nádobka pro multikanálovou pipetu
- Umělohmotné pipety
- Centrifuga pro mikrodestičky
- Termostat 37°C.
- Třepačka na mikrodestičky.

Všechna diagnostika se vytemperují na pokojovou teplotu (18–25 °C).

1. Z plastického sáčku se vyjme mikrodestička MASPAT s požadovaným počtem jamek. Nepoužité jamky se mohou uchovávat v plastickém sáčku s desikantem.
2. Pomocí **umělohmotné** přenosové pipety se do příslušných jamek (pro sérum pacienta, MASPAT positive control, MASPAT negative control) přenesou po jedné kapce (50 µL) PRP nebo PC dárce. Doporučuje se provést MASPAT positive control, MASPAT negative control pro každý strip po 8 jamkách.
3. Mikrodestička se centrifuguje 5 minut při 50 rcf, aby se trombocyty navázaly k povrchu jamky mikrodestičky (**bez brzdění**).
4. Nenavázané trombocyty se po dekantaci odstraní 3násobným ručním promytím jamek mikrodestičky 150 µL PBS/Tween 0,005%. Promývací roztok se přidává do jamek pomocí vícekanálové pipety. PBS/Tween se mezi promytím odstraní obrácením destičky a vytřepáním.
5. Do každé jamky se přidají 2 kapky (100 µL) MASPAT LISS má růžovou barvu.
6. Do příslušných jamek se přidá 1 kapka (50 µL) MASPAT positive nebo negative control.
7. Do zbývajících jamek obsahujících dárcovský trombocytární monolayer se přidá jedna kapka (50 µL) pacientova séra.
8. Mikrodestička se třepě na třepačce 10 sekund při 800 ot/min. (Sarstedt, TMP-2). Růžová barva LISS se změní na modrou.
9. Mikrodestička se inkubuje 30 minut při 37 °C (během inkubace se destička přikryje fólií).
10. Jamky mikrodestičky se po dekantaci 5⁺ ručně promyjí 150 µL PBS/Tween jako v bodě 4.
11. Bezprostředně po promytí se do každé jamky přidá jedna kapka (50 µL) MASPAT anti-IgG.
12. Do každé jamky se přidá jedna kapka (50 µL) MASPAT Indicator Red Cells. Obsah jamek se jemně protřepe.
13. Mikrodestička se centrifuguje při 200 rcf 5 minut (bez rozbíjení).
14. Výsledky reakcí se odečítají makroskopicky nebo pomocí automatického readeru.

*V případě, že se promytí provádí pomocí automatu, doporučuje se provést validaci promývání.

Hodnocení

Positivní nebo slabě pozitivní reakce (erythrocyty tvoří layer na dně jamky) indikují přítomnost trombocytárních a/nebo HLA specifických protilátek v séru.

Negativní reakce (erythrocyty tvoří terčík na dně jamky) indikují nepřítomnost trombocytárních a/nebo HLA specifických protilátek v séru.



pozitivní



slabě pozitivní



negativní

Pro detekci případných autoprotilátek navázaných na trombocyty dárce se provádí MASPAT negative control

V případě, že se požaduje u pacienta autokontrola, sérum pacienta se testuje s jeho vlastními trombocyty získanými ze vzorku krve s EDTA.

Zesílení reaktivity trombocytů: zmrazení destiček dárce (PC nebo PRP) nejméně na 30 minut (při <-18 °C) zesílí jejich reaktivitu. Po zmrazení lze destičky uchovávat po dobu až 8 týdnů.

PC se může naředit sequestrinovým pufrům.

Složení skladovaného sequestrinového pufru (10x koncentrovaného):

- 0,175 M Na₂HPO₄·2H₂O
- 0,089 M Na₂EDTA·2H₂O (Titriplex III)
- 1,54 NaCl

rozpustit v čištěné vodě.

pH: 6,8-7,0

Sequestrinový pufr 10x koncentrovaný se před použitím naředí 1:10 čištěnou vodou. Uchovává se při pokojové teplotě (18–25 °C).

Expirace u pufru je 1 rok, u naředěného pracovního roztoku 1 týden.

Omezení

Promývací roztok se musí přidávat pomalu, prudké promytí by mohlo odstranit jak navázané tak nenavázané trombocyty. V případě, že promytí bylo provedeno správně, povrch jamek by měl být opalescentní. Nepravidelné „otvory“ v destičkovém monolayeru znamenají, že promytí bylo nesprávné. V tomto případě se musí vytvoření layeru opakovat v nových mikrodestičkových jamkách (bod. 3–5).

Falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny kontaminací testovaného materiálu nebo odchylkami od doporučené techniky.

Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytnout v případě, kdy trombocyty dárce/pacienta jsou ABO

inkompatibilní s testovaným sérem, jestliže jsou na trombocytech dárce navázány IgG autoprotilátky nebo v případě, že koncentrace trombocytů je příliš nízká (<0,5 × 10⁹/mL). Pro zjištění, zda krevní destičky dárce obsahují protilátky, lze provést test s destičkami dárce + negativní kontrolu nebo s destičkami dárce + sérum dárce.

U MASPAT positive control se mohou vyskytnout falešně negativní výsledky, pokud u použitých trombocytů chybí antigen HPA-1a HPA-3a.

V případě, že není optimalizována rychlost a doba centrifugace, může dojít ke snížené adhezenci trombocytů. Výsledkem menšího potažení jamek než je optimální, je neadekvátní průběh testu se snížením jak citlivosti, tak síly reakce v konečném výsledku testu. Nedostatečné promytí před přidáním MASPAT anti-IgG reagensie a/nebo MASPAT Indicator Red Cells může způsobit falešně negativní reakce.

Pomalější centrifugace mikrodestiček po přidání MASPAT Indicator Red Cells může vést k falešně pozitivním reakcím u všech testů (včetně negativních kontrol). Falešně pozitivní reakce mohou být také výsledkem nesprávně suspendovaných MASPAT Indicator Red Cells.

Rychlejší centrifugace destiček po přidání MASPAT Indicator Red Cells může způsobit falešně negativní výsledky u všech testů (včetně pozitivní kontroly).

Reference

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).

Sanquin zaručuje, že funkční charakteristiky jejích produktů budou takové, jaké jsou popsány v původních návodech k použití od výrobce. Je nezbytné přesně dodržovat postupy, rozvržení testů a doporučení k činidlům a vybavení. Nadace Sanquin se zříká veškeré zodpovědnosti v případě jakýchkoli odchylek od těchto postupů, rozvržení a doporučení.