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 (sv)

Endast för professionellt bruk

Solid fasanalys för detektion av trombocytantikroppar

Allmän information
MASPAT-setet (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) innehåller belagda MASPAT-mikroplattor (12 remsor med 8 brunnar), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positiv control och MASPAT negative control. MASPAT-setet uppfyller kraven för gällande standarder och riktlinjer. Produktens egenskaper finns specificerade i det analyscertifikat som medföljer produkten på begäran. Testprincipen bygger på solid fasteknik, vilken baseras på en antigen-/antikroppsreaktion. Ett monoskikt med trombocyter från donatorn immobiliseras genom centrifugering till mikroplattbrunnens yta som är belagd med trombocytspecifika monoklonala antikroppar från möss. Patientserum och LISS (Low Ionic Strength Solution) inkuberas i lämpliga brunnar där serumantikroppar tillåts bindas till det immobiliserade trombocytmonoskiktet. Efter inkubation tvättas obundna serumkomponenter bort. Trombocytbundna antikroppar detekteras genom tillsats av monoklonalt anti-humant IgG från möss och humana IgG-sensibiliserade erytrocyter (MASPAT Indicator Red Cells) och efterföljande centrifugering av mikroplattan. Om reaktionen är positiv binder det anti-humana IgG och MASPAT Indicator Red Cells till IgG-antikropparna på trombocytens monoskikt. Positiva reaktioner kännetecknas därmed genom att MASPAT Indicator Red Cells fastnar på brunnarnas ytor, medan negativa reaktioner producerar diskreta pelletar av MASPAT Indicator Red Cells mitt i brunnen. Medtagandet av MASPAT positive control och MASPAT negative control med varje serie test rekommenderas starkt.

Setdelar:

MASPAT Microplate (REF K1366): en mikroplatta med U-formad botten bestående av 12 remsor med 8 brunnar. Alla brunnar är belagda med trombocytspecifika monoklonala antikroppar. Förvaras vid 2-8°C. MASPAT-mikroplattan är vakuumförseglad i en plastpåse innehållande torkmedel. Efter att brunnarna har tagits ut ur påsarna kan de användas i upp till 4 veckor om de förvaras vid 2–8°C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362): Lösning med låg jonstyrka. Förvaras vid 2–8°C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363): Innehåller trombocytspecifika antikroppar.
Förvaras vid 2–8°C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364): Innehåller inga trombocytspecifika antikroppar. Förvaras vid 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 mL (REF K1361): Monoklonala antikroppar från möss specifikt för humana IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Förvaras vid 2–8°C.

Säkerhetsföreskrifter
Reagenserna skall endast användas för in-vitro-diagnostik. Reagenserna bör förvaras vid 2–8°C. Läckande eller skadade reagensflaskor får ej användas. Reagenser (oöppnade eller öppnade) bör inte användas efter det utgångsdatum som är tryckt på flaskans etikett. NaN_3 0,1% (w/v) används som konserveringsmedel. Även om blodprodukter har testats på smittfarliga sjukdomar och funnits vara negativa, kan det inte uteslutas att de innehåller några smittfarliga ämnen.
Iakttag försiktighet vid användning och hantering av behållare och deras innehåll. Grumlighet kan vara tecken på bakteriell kontamination. För att upptäcka tecken på nedbrytning av reagens rekommenderas att reagenserna testas som en del av laboratoriets interna kontrollprogram, genom användning av lämpliga kontroller. Bortförskaffande av avfall, efter testets slutförande, ska ske i enlighet med laboratoriets egna föreskrifter.

Provtagning och förberedelser
Serumprover ska erhållas från koagulerat blod efter centrifugering vid 1500 rcf i 10 minuter. Om test av serum försenas, skall proverna förvaras vid <–18°C.
PC (Platelet Concentrates) eller PRP (Platelet Rich Plasma) kan användas i provet. För preparation av PRP ska allt blod som samlades in i EDTA centrifugeras vid 400 rcf i 10 minuter. PRP-fraktionen kan användas omedelbart, outspädd.

Testutförande
Material som krävs men som inte medlevereras:
- MASPAT Indicator Red Cells 0,3 % (REF K1139) av sensibiliserade erytrocyter i konserveringsmedel.
- Multikanals pipett lämplig för 50, 100 och 150 µL och engångspetsar.
- (PBS) fosfatbuffrad koksaltlösning Tween 20.
- Behållare för multikanals pipett.
- Överföringspipetter av PLAST för engångsbruk.
- Centrifug lämplig för mikroplattor.
- 37°C inkubator.
- Mikroplattsskak.

Låt alla reagenser nå rumstemperatur (18–25°C).

1. Ta ut MASPAT-mikroplattan med önskat antal mikroplattsbrunnar ur påsen. De oanvända brunnarna förvaras i plastpåsen med torkmedel.
2. Tillsätt 1 droppe (50 µL) av donatorns PRP eller PC med en överföringspipett av **plast** till önskade brunnar (för patientserum, MASPAT positive control, MASPAT negative control). vi rekommenderar att MASPAT positive- och MASPAT negative control utförs för varje platta med 8 brunnar.
3. Centrifugera mikroplattan i 5 minuter vid 50 rcf för att immobilisera trombocyter till mikroplattsbrunnarnas ytor **(utan uppehåll).**
4. Dekantera och ta bort alla obundna trombocyter genom att tvätta mikroplattsbrunnarna manuellt 3* gånger med 150 µL PBS/Tween 0,005 %. Tvättlösningen bör droppas i med hjälp av en multikanals pipett. Dekantera PBS/Tween mellan tvättningarna genom att invertera och snärta till.
5. Lägg till 2 droppar (100 µL) av MASPAT LISS i varje brunn. LISS är lilafärgat.
6. Lägg till 1 droppe (50 µL) av MASPAT positive- eller negative control i lämpliga brunnar.
7. Lägg till 1 droppe (50 µL) av patientserum i de återstående brunnarna innehållande trombocytmonoskikt från donatorn.
8. Skaka i ett mikroplattsskak i 10 sekunder vid 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). Den lila färgen på LISS bör bli blå.
9. Inkubera mikroplattan vid 37 °C i 30 minuter (förslut mikroplattan under inkubation).
10. Dekantera och tvätta mikroplattsbrunnarna manuellt 5* gånger med 150 µL av PBS/Tween som i steg 4.
11. Lägg till 1 droppe (50 µL) av MASPAT anti-IgG-reagens i varje brunn omedelbart efter tvättning.
12. Lägg till 1 droppe (50 µL) av MASPATIndicator Red Cells i varje brunn. Skaka försiktigt.
13. Centrifugera mikroplattan vid 200 rcf i 5 minuter (**utan uppehåll**).
14. Avläs för agglutinat makroskopiskt eller med en automatisk avläsare.

* Om tvättningen sker automatiskt rekommenderar vi att tvättningsstegen valideras.

Tolkning

En positiv eller svag positiv reaktion (erytrocyter formar ett lager över brunnens botten) indikerar förekomst av trombocyt och/eller HLA-specifika antikroppar i serumet.
En negativ reaktion (erytrocyter formar en knapp i brunnens botten) indikerar frånvaro av trombocyt och/eller HLA-specifika antikroppar i serumet.

positiv

svagt positiv

negativ

MASPAT negative control måste utföras för att fastställa autoantikroppar bundna till trombocyterna från donatorn.
Om en patientautokontroll krävs måste patientserumet testas mot patientens egna trombocyter som avleds från ett EDTA blodprov.

Förbättring av trombocyternas reaktivitet: frysning av trombocyter från donatorn (PC eller PRP) i minst 30 minuter (<-18°C) förbättrar deras reaktivitet. Efter frysning kan ftalaterna förvaras i upp till 8 veckor.

PC:er kan spädas ut med sekvestrerad buffert.
Sammansättning av lösning av sekvestrerad buffert för förvaring (10x koncentrerad):

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

Upplöst i demivatten
pH: 6,8 – 7,0
Sekvestrerad buffert 10x koncentrerad bör spädas ut 1:10 i demivatten före användning.
Förvaras vid rumstemperatur (18–25°C). Förvaringstid för lösning som förvaras: 1 år, utspädd lösning 1 vecka.

Begränsningar

Tvättlösningen bör hällas i långsamt, då kraftig tvättning kan ta bort både bundna och obundna trombocyter. Brunnens yta bör vara opak om tvättningsproceduren har utförts på ett korrekt sätt. Oregelbundna ”hål” i trombocytens monoskikt indikerar felaktig tvättningsprocedur. Om detta uppstår måste ett nytt monoskikt göras med hjälp av nya mikroplattsbrunnar (steg 3–5).
Falska positiva eller falska negativa resultat kan uppstå genom kontamination av testmaterial eller vid avvikelse från rekommenderad teknik.
Falska positiva resultat kan uppstå om donatorns / patientens trombocyter är ABO-inkompatibla med serumet som testas, om IgG autoantikroppar är bundna till trombocyter från donatorn eller om koncentrationen av trombocyter är för låg (<0,5 x 10^8/mL). För att testa om trombocytantikropparna bär autoantikroppar, kan testet utföras med donatortrombocyter + negative control eller med donatortrombocyter + donatorserum.
Falska negativa resultat kan uppstå med MASPAT positive control när de använda trombocyterna saknar antigenerna HPA-1a och HPA-3a.
Om centrifugeringshastigheten och tiden inte har optimerats kan vidhäftningen av trombocyter till mikroplattan vara dålig. Suboptimal beläggning av brunnarna kommer att resultera i inadekvat utförande av test genom att reducera både känsligheten och styrkan av reaktionerna i de slutliga provresultaten.
Otillräcklig tvättning före MASPAT anti-IgG-reagens och/eller MASPAT Indicator Red Cells tillsätts, kan resultera i falska negativa reaktioner.
Undercentrifugering av mikroplattan efter tillsats av MASPAT Indicator Red Cells kan leda till falska positiva resultat i alla prover (inklusive negativ kontroll). Falska positiva reaktioner kan även bli resultatet om man misslyckas att på ett korrekt sätt omsuspendera MASPAT Indicator Red Cells.
Övercentrifugering av mikroplattan efter tillsats av MASPAT Indicator Red Cells kan leda till falska negativa resultat i alla prover (inklusive positiv kontroll).

Referenser

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 produkter ger garanterat de prestanda som beskrivs i originaltillverkarens bruksanvisning. Det är mycket viktigt att strängt följa beskrivna procedurer, testuppställningar och rekommenderade reagensmedel och apparatur. Sanquin frånsäger sig allt ansvar till följd av att detta försummas.