

# MACE<sup>®</sup>2 (Modified Antigen Capture ELISA)

## ΕΝΔΕΛΕΙΓΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

MACE<sup>®</sup>2 είναι μια ποιοτική, στερεάς φάσης ενζυματική ανοσοδεσμευτική μέθοδος ανάλυσης (ELISA) για την ανίχνευση αντισώματα κατά αντιγόνων κατά επιτόπων πάνω στις γλυκοπρωτεΐνες Ia/IIa, Ib/IX, και IV των αιμοπεταλίων.

Για *Εργαστηριακή Διαγνωστική Χρήση*.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η ύπαρξη ειδικών αντιγόνων αιμοπεταλίων επάνω σε διάφορες γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων, έχει περιγραφεί από πολλούς ερευνητές.<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Αντισώματα κατά ειδικών αντιγόνων αιμοπεταλίων εξ' αιτίας κήσης ή μετάγγισης, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανοσοκαταστροφή των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.<sup>7,8,9</sup> Η επιβεβαίωση της ύπαρξης αυτών των αντισωμάτων στον ορό των ασθενών, μπορεί να είναι βοηθητική στην έρευνα, εν δυνάμει συμβατών, προϊόντων αίματος.

Τα μικροβυθίσματα MACE<sup>®</sup>2 παρέχουν ακινητοποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα σχεδιασμένα να δεσμεύουν τις γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων Ia/IIa, Ib/IX ή IV. Η εξέταση είναι σχεδιασμένη να ανιχνεύει και να διαφοροποιεί τα ειδικά αντισώματα έναντι αιμοπεταλίων, τα οποία κατευθύνονται εναντίον των αιμοπεταλίων των δοτών ή των ασθενών.

## ΑΡΧΗ

Ορός ή πλάσμα του ασθενούς επωάζεται με άθικτα αιμοπετάλια επιτρέποντας στα αντισώματα, εάν υπάρχουν, να δεσμευτούν στις γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων. Τα μη δεσμευθέντα αντισώματα εκπλένονται από τα αιμοπετάλια. Τα ευαισθητοποιημένα με αντίσωμα αιμοπετάλια, στη συνέχεια διαλυτοποιούνται με την πρόσθεση του ρυθμιστικού διαλύματος Λύσης, το οποίο περιέχει ένα μη-ιοντικό απορρυπαντικό. Το προϊόν λύσης αιμοπεταλίων που περιέχει ευαισθητοποιημένες διαλυτές γλυκοπρωτεΐνες, μεταφέρεται στα μικροβυθίσματα. Αυτό επιτρέπει στις γλυκοπρωτεΐνες (ευαισθητοποιημένες ή μη με αντισώματα του ασθενούς) των αιμοπεταλίων και τις γλυκοπρωτεΐνες να δεσμευτούν από ακινητοποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα. Παρόμοιο χειρισμό έχουν και δείγματα ελέγχου. Μετά από μια σύντομη περίοδο επώασης οι γλυκοπρωτεΐνες εκπλένονται.

Αντιδραστήριο αλκαλικής φωσφατάσης σημασμένης με αντιανθρώπινη αιμοσφαιρίνη (Αντι-IgG) προστίθεται στα βυθίσματα και επωάζεται. Το μη δεσμευμένο Αντι-IgG εκπλένεται και προστίθεται το υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση). Μετά από περίοδο επώασης 30 λεπτών, η αντίδραση διακόπτεται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Η οπτική πυκνότητα της αποκτώμενης χρώσης μετράται με φασματοφωτόμετρο. Το θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την παρουσία αντισώματος ειδικού στις προσδεδμενες γλυκοπρωτεΐνες GPIa/IIa, GPIb/IX, ή GPIV.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Ανώτατος αριθμός αναλύσεων ανά διαγνωστικό σύνολο: 30

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται όπως αναγράφεται στην ετικέτα.

- |            |  |
|------------|--|
| <b>MS</b>  | 1. Μικροβυθίσματα: Μικροβύθισμα ταινιών επίπεδου πυθμένα στο οποίο έχουν ακινητοποιηθεί μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τις γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων<br>4-1x8 <b>μωβ</b> ταινίες ειδικές για GPIa/IIa<br>4-1x8 <b>πορτοκαλί</b> ταινίες ειδικές για GPIb/IX<br>4-1x8 <b>μαύρες</b> ταινίες ειδικές για GPIV<br>Οι ταινίες μικροβυθισμάτων εσωκλείονται σε επανασφραγιζόμενη θήκη αλουμινίου. Έτοιμα προς χρήση. |
| <b>TCW</b> | 2. Συμπυκνωμένο (10x) Πλυστικό: Αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρι (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο περιέχον χλωριούχο νάτριο και Tween 20. 1% νατραζίδιο. Αραιώστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό προ χρήσης. Αποθηκεύσατε το Πλυστικό Διάλυμα έως 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή έως και επτά μέρες σε θερμοκρασία 2-8°C.  |
| <b>TSD</b> | 3. Δείγμα Διαλύτη: Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris περιέχον χλωριούχο νάτριο. 0.05% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση.   |

- |            |   |
|------------|---|
| <b>SB</b>  | 4. Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος: Αυτό το διάλυμα περιέχει διαιθανολαμίνη και χλωριούχο μαγνήσιο. 0.02% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψατε από το Φως.                                     |
| <b>SS</b>  | 5. Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης: 3 M Υδροξείδιο του Νατρίου. Έτοιμο προς χρήση. Χρησιμοποιείτε με προσοχή.   |
| <b>AG</b>  | 6. Σύζευγμα: Σύζευγμα Αλκαλικής φωσφατάσης αιγός με αντίσωμα ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης υψηλώς κεκαθαυμένο G (IgG). 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης.                        |
| <b>PN</b>  | 7. Υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση): Κρυσταλλική σκόνη. Ανασυστήστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό και αραιώστε στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος προ χρήσης. Προστατέψατε από το Φως. |
| <b>PC</b>  | 8. Θετικός ορός Ελέγχου. Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση.   |
| <b>NC</b>  | 9. Αρνητικός ορός Ελέγχου. Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση.   |
| <b>CRP</b> | 10. Διάλυμα Εναιωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών: Ρυθμιστικό Διάλυμα Φοσφορικών περιέχον αλβουμίνη βοός. 0.1% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση.  |
| <b>CLB</b> | 11. Ρυθμιστικό Διάλυμα Κυτταρικής Λύσης (10X): Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris περιέχον μη-ιοντικό απορρυπαντικό. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό προ χρήσης.                     |
| <b>NCP</b> | 12. Φυσιολογικός Ορός Ελέγχου Αιμοπεταλίων: Αποξηραμένα σε κενό αέρος ανθρώπινα αιμοπετάλια. Ενυδατώστε εκ νέου, προ χρήσης με το Διάλυμα Εναιωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών.                     |
| <b>PS</b>  | 13. Μεμβράνες κάλυψης πλακών.   |

## **ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

- Μην χρησιμοποιείτε μολυσμένα ή θολά αντιδραστήρια.
- ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ προσοχή προς αποφυγήν μόλυνσης του Διαλύτη Δείγματος και του Συζεύγματος. Η εξ' αμελείας μόλυνση αυτών των αντιδραστηρίων με ανθρώπινο ορό ή πλάσμα θα έχει ως αποτέλεσμα την ουδετεροποίηση του Συζεύγματος και ως εκ τούτου, την αποτυχία της ανάλυσης.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια πέραν της αναγραφόμενης ημ/ίας λήξης.
- Τα, περιεχόμενα στο διαγνωστικό σύνολο, μικροβυθίσματα και αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με άλλο σύστημα ανάλυσης.
- Υποκατάσταση των συστατικών με άλλα, από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Απορρίψατε όποιες ποσότητες αραιωμένου Συζεύγματος, αραιωμένου Θετικού και Αρνητικού Ορού Ελέγχου, και αραιωμένου ή ανασυσταμένου αντιδραστηρίου PNPP μετά από κάθε ανάλυση.
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris περιέχον μη-ιοντικό απορρυπαντικό. Αραιώστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό προ χρήσης.
- Κατά τις αραιώσεις, ακολουθείστε τις οδηγίες του κατασκευαστή των διανεμητών για τις τεχνικές διανομής και έκπλυσης.
- Η κατά την τελευταία επώαση, αντίδραση ενζυματικού υποστρώματος, είναι ευαίσθητη στην θερμοκρασία και πρέπει να διενεργείται σε ελεγχόμενη περιοχή, σε θερμοκρασία 22-25°C.
- Εξ' αιτίας μεταβολών στα όργανα ή υψηλότερων ή χαμηλότερων θερμοκρασιών δωματίου, συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώνει συγκεκριμένο χρόνο επώασης, ελάχιστα μεγαλύτερο ή μικρότερο, προκειμένου να έχει συνεπή και αξιόπιστα αποτελέσματα των ορών ελέγχου. Επειδή η θερμοκρασία της τελευταίας επώασης ενδέχεται να επηρεάσει τις τιμές των ορών ελέγχου, είναι σημαντικό να ελέγχεται περιοδικά η, σε θερμοκρασία δωματίου, διαδικασία της επώασης.

## **ΠΡΟΣΟΧΗ**

- Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι στους Θετικούς και Αρνητικούς Ορούς Ελέγχου για αυτό το προϊόν ανθρώπινοι οροί, έχουν εξεταστεί και βρεθεί αρνητικοί για αντισώματα κατά HIV, HCV και HbsAg από τις εγκεκριμένες μεθόδους του FDA.

Ωστόσο, καμία μέθοδος ελέγχου δεν μπορεί να εγγυηθεί απόλυτα την απουσία του ιού HIV, Ηπατίτιδας C, Ηπατίτιδας B, ή άλλων μολυσματικών παραγόντων. Ως εκ τούτου ο χειρισμός αυτών των υλικών συνιστάται να είναι τέτοιος ως εάν να επρόκειτο για εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.

- Κάποια από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο αντιδραστήρια περιέχουν νατραζίδιο ως συντηρητικό. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Το νατραζίδιο αντιδρά με τον χαλκό και τον μόλυβδο των υδραυλικών σωληνώσεων και σχηματίζει εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Όταν απορρίπτετε το αντιδραστήριο, περιχύστε το με άφθονο νερό ούτως ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αζιδίων. Το νατραζίδιο είναι δηλητήριο και τοξικό αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή απορροφηθεί από τις βλεννογόνους μεμβράνες.
- Το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (NaOH) είναι διαβρωτικό. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Τυχούσα πτώση του διαλύματος πρέπει να καθαρίζεται αμέσως.
- Απορρίψατε όλα τα συστατικά όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση σύμφωνα με τους, κατά τόπους, κανονισμούς.

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Το αίμα θα πρέπει να συλλέγεται σε ACD (πλάσμα) ή χωρίς αντιπηκτικό (ορός) χρησιμοποιώντας ασηπτική τεχνική και πρέπει να εξετάζεται ενόσω είναι φρέσκο ακόμα, προκειμένου να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων, εξ' αιτίας είτε ακατάλληλης αποθήκευσης είτε μόλυνσης του δείγματος.

Ορός ή Πλάσμα : Τα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να εξεταστούν αμέσως, πρέπει είτε να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8°C επί όχι περισσότερο από 48 ώρες, είτε να καταψύχονται. Τα δείγματα που καταψύχονται σε θερμοκρασία -20°C ή χαμηλότερη, παραμένουν σε καλή κατάσταση για αρκετό καιρό (2-3 χρόνια). Ωστόσο, προκειμένου να αποφευχθούν οι καταστροφικές επιπτώσεις της επαναλαμβανόμενης κατάψυξης-απόψυξης, συνιστάται η τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικά φιαλίδια κατάψυξης και η αποθήκευσή τους σε μικρές ποσότητες στην κατάψυξη. Αποφύγετε την χρήση καταψυκτών χωρίς πάγο.

Ο ορός ή το πλάσμα θα πρέπει να διαχωρίζεται από τα ερυθρά κύτταρα όταν αποθηκεύεται ή αποστέλλεται.

Μόνο ολικός ο ανθρώπινος ορός ή πλάσμα είναι κατάλληλος για αυτή την ανάλυση. Προηγούμενη αραίωση των δειγμάτων με οτιδήποτε άλλο από φυσιολογικό αρνητικό ανθρώπινο ορό ELISA, θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Αποφύγετε την χρήση μικροβιακά μολυσμένων, λιπαιμικών, ικτερικών, ή αδρανοποιημένων με θέρμανση δειγμάτων, διότι μπορεί να προκύψουν μη συνεπή αποτελέσματα.

### **Αιμοπετάλια:**

- Τα δείγματα αιμοπεταλίων πρέπει να συλλέγονται σε CPD ή ACD και να ελέγχονται μέσα σε 7 ημέρες. Εάν δεν πρόκειται να ελεγχθούν άμεσα, τα αιμοπετάλια πρέπει να φυλαχθούν σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C). Δείγματα αιμοπεταλίων που προέρχονται από συγκεντρωμένα αιμοπετάλια πρέπει να ελέγχονται στην συγκεκριμένη περίοδο που αναφέρθηκε.
- Απαιτείται : 2-3 mL πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια ( $\leq 400,000$  ανά  $\mu\text{L}$ ) ή 0.25 mL συγκεντρωμένων αιμοπεταλίων ή 15  $\mu\text{L}$  εναιώρημα 50% πλυμένων αιμοπεταλίων για κάθε δείγμα που θα ελεγχθεί. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια μπορεί να παραχθεί φυγοκεντρώντας ολικό αίμα στις Platelet-rich plasma can be 2000X g για 3 λεπτά.
- Τα αιμοπετάλια πρέπει να φυγοκεντρούνται στον συγκεκριμένο χρόνο και στροφές ώστε να υπάρχει ιζηματοποίηση. Η υπερβολική φυγοκέντρηση, παρόλα αυτά, πρέπει να αποφεύγεται. Οι προτεινόμενοι χρόνοι φυγοκέντρησης είναι 580 x g για 20 λεπτά, 2,000 x g για 10 λεπτά, ή 5,000 x g για 6 λεπτά. Κάθε εργαστήριο πρέπει να βελτιστοποιήσει τον χρόνο και την ταχύτητα αναλόγως τον εξοπλισμού.

### **Φύλαξη Αιμοπεταλίων:**

Προετοιμάστε το ίζημα των αιμοπεταλίων όπως περιγράφηκε στο βήμα 5. Πετάξτε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιήστε σε 0.25 mL από το Διάλυμα Εναιωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών. Αυτό το εναιώρημα μπορεί να φυλαχθεί στους 2 έως 8°C μέχρι 7 ημέρες.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### **Παρεχόμενα Υλικά:**

Τα φιαλίδια ενδεχομένως να περιέχουν περισσότερο αντιδραστήριο από το περιγραφόμενο στις ετικέτες. Βεβαιωθείτε ότι μετράτε το αντιδραστήριο με μια κατάλληλη συσκευή κατά την αραίωση.

1. 12 – 1 x 8 Ταινίες Μικροβυθισμάτων με βάση στήριξης
2. 1 x 50 mL Συμπυκνωμένο Πλυστικό
3. 1 x 14 mL Διαλύτης Δείγματος
4. 1 x 14 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος
5. 1 x 14 mL Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης
6. 1 x 80  $\mu$ L Σύζευγμα Αντιανθρώπινης IgG
7. 4 x 50 mg PNPP Υπόστρωμα
8. 1 x 0.7 mL Θετικός ορός ελέγχου
9. 1 x 0.7 mL Αρνητικός ορός ελέγχου
10. 2 Φιαλίδια Φυσιολογικού Ορού Ελέγχου Αιμοπεταλίων (50  $\mu$ L ενυδατωμένα)
11. 1 x 2.5 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Κυτταρικής Λύσης
12. 1 X 50 mL Διάλυμα Εναιωρήματος Κυττάρων και Συντηρητικών
13. 8 Ταινίες σφράγισης Πλακών

### **Πρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά:**

1. Δοκιμαστικοί σωλήνες για τα δείγματα ασθενών και αραιώσεις ορών ελέγχου και αντιδραστηρίων
2. Πιπέτες μεταφοράς
3. Προσαρμοσίμες μικροπιπέτες διανομής 10 – 100  $\mu$ L και 100 – 1,000  $\mu$ L και ρύγχη μιας χρήσης
4. Χρονόμετρο
5. Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας ικανή να μετρά ΟΠ σε 405 ή 410 και 490 nm
6. Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
7. Απορροφητικές πετσέτες χαρτιού
8. Συσκευή πλύσης μικροπλάκας
9. Συσκευή φυγοκέντρισης για τον διαχωρισμό του ορού ή του πλάσματος των δειγμάτων
10. Συσκευή επώασης ή υδατόλουτρο 37°C
11. Φιαλίδια μικροφυγοκέντρισης
12. Μικροφυγοκέντριση αιμοπεταλίων

### **Διαδικασία Ανάλυσης**

1. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου
2. Φτιάξτε το διάλυμα Πλυστικού, αραιώνοντας το. Προσθέστε 1 όγκο Συμπυκνωμένου Πλυστικού σε 9 Όγκους απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού. Αναμείξτε καλά.
3. Καθορίστε τον αριθμό των, προς εξέταση, δειγμάτων των ασθενών. Χρησιμοποιείστε το Φύλλο Καταγραφής για να προσδιορίσετε την θέση σε μικροβύθισμα και σειρά. Η θέση κάθε δείγματος αποτελείται από δύο (εις διπλούν) στήλες. Σημειώστε την ταυτότητα του δείγματος στο Φύλλο Καταγραφής.

### **ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ**

4. Προετοιμασία Θετικών και Αρνητικών Ορών Ελέγχου
  - a) Ενυδατώστε εκ νέου ένα φιαλίδιο του φυσιολογικού ορού ελέγχου των αιμοπεταλίων σε αποξηραμένη μορφή, προσθέτοντας 400  $\mu$ L Διάλυμα Εναιωρήματος κυττάρων και συντηρητικών.
  - b) Αφήστε να σταθεί επί 10-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  - c) Αναμείξτε καλά τα εκ νέου ενυδατωμένα αιμοπετάλια.
  - d) Φυγοκεντρείστε για να πάρετε το ίζημα των κυττάρων.
  - e) Αναρροφήστε το υπερκείμενο, και αφυγράνετε τους σωλήνες.
  - f) Προσθέστε 50  $\mu$ L Διάλυμα Εναιωρήματος κυττάρων και συντηρητικών στο ίζημα των αιμοπεταλίων

- g) Αναμείξτε καλά με την άκρη μιας πιπέτας. Μεταφέρετε 15  $\mu\text{L}$  του εναιωρήματος αιμοπεταλίων σε κάθε ένα από τους δύο καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
- h) Προσθέστε 150  $\mu\text{L}$  του Θετικού Ορού Ελέγχου σε έναν από τους σωλήνες. Βάλτε ετικέτα «Θετικός ορός ελέγχου» Προσθέστε 150  $\mu\text{L}$  του Αρνητικού Ορού Ελέγχου στον άλλο σωλήνα. Βάλτε ετικέτα «Αρνητικός ορός ελέγχου». ANAMEIΞATE KΑΛΑ.

#### Προετοιμασία Αιμοπεταλίων Ασθενών:

5. Για κάθε δείγμα που θα προετοιμαστεί, τοποθετείστε 2 – 3 mL πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (όγκος να μην περνάει τα 400,000 ανα  $\mu\text{L}$ ) ή 0.25 mL συγκεντρωμένων αιμοπεταλίων σε σωληνάριο μικροφυγόκεντρου και φυγοκεντρείστε ώστε να πάρετε το ίζημα. Απορρίψτε το υπερκείμενο πλάσμα.
6. Προσθέστε 400  $\mu\text{L}$  του αντιδραστηρίου Cell Resuspension and Preservative Solution στο ίζημα και ANAKINEIΣTE KΑΛΑ. Φυγοκεντρείστε ώστε να πάρετε το ίζημα
7. Αναποδογυρίστε το σωληνάριο και απορρίψτε το υπερκείμενο. Επαναλάβετε τα βήματα 6 και 7 σε σύνολο 3 έως 4 πλύσεις. Μετά την τελευταία πλύση, στεγνώστε σε απορροφητικό χαρτί. Αφήστε το υπερκείμενο να απορροφηθεί.
8. Υπολογίστε τον όγκο του κάθε ιζήματος αιμοπεταλίων. Κάνετε ενειώρημα 50% από το κάθε ένα προσθέτοντας ίσο όγκο Cell Resuspension and Preservative Solution στο ίζημα. Ανακινείστε καλά ώστε να επιτύχετε ομογενοποιημένο εναιώρημα. Μεταφέρετε 15  $\mu\text{L}$  του 50% εναιωρήματος σε καθαρό σημειωμένο σωληνάριο.
9. Προσθέστε 150  $\mu\text{L}$  ορού ή πλάσματος ασθενούς σε κάθε σωληνάριο που περιέχει το εναιώρημα από το προηγούμενο βήμα. ANAKINEIΣTE KΑΛΑ με την βοήθεια πιπέτας.
10. Επωάστε τους μάρτυρες και τα δείγματα για 30 – 35 λεπτά στους 37°C. Εάν χρησιμοποιείται ξηρό επωαστικό αυξάνετε τον χρόνο κατά 10 λεπτά.
11. Πλύνετε δείγματα και μάρτυρες δύο φορές προσθέτοντας 400  $\mu\text{L}$  του αντιδραστηρίου Cell Resuspension and Preservative Solution σε κάθε σωληνάριο και φυγοκεντρώντας ώστε να παίρνετε το ίζημα. Απορρίπτετε το υπερκείμενο μετά από κάθε έκπλυση. Στεγνώστε τα σωληνάρια σε απορροφητικό χαρτί, προσέχοντας να μην πειραχτεί το ίζημα.
12. Αραιώστε το Cell Lysis Buffer: Προσθέστε 100  $\mu\text{L}$  από το Cell Lysis Buffer σε 900  $\mu\text{L}$  απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Ετοιμάστε 1.0 mL αραιωμένο ρυθμιστικό για κάθε τρία δείγματα προς λύση. ANAKINEIΣTE KΑΛΑ.
13. Για να λύσετε τα αιμοπετάλια, προσθέστε 180  $\mu\text{L}$  αραιωμένου Cell Lysis Buffer σε κάθε σωληνάριο δείγματος και μάρτυρα. ANAIKEIΣTE KΑΛΑ με πιπέτα ή vortex για να επιτύχετε την λύση. Αμέσως προχωρείστε στα επόμενα βήματα. Τα λυμένα αιμοπετάλια πρέπει να χρησιμοποιούνται το συντομότερο.

#### ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ

14. Αφαιρέστε το πλαίσιο με τα μικροβυθίσματα από τη θήκη. Αμέσως αφαιρέστε και επανασφραγίστε τις ταινίες που δεν χρειάζονται, στην προστατευτική θήκη.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Αμέσως αφαιρέστε και επανασφραγίστε τις αχρησιμοποίητες ταινίες στην προστατευτική θήκη.  
Σημείωση: Παρέχεται μόνο ένα πλαίσιο στο διαγνωστικό σύνολο. Μην το πετάξετε έως ότου χρησιμοποιηθούν όλες οι ταινίες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Προσανατολίστε τα βοηθία με το A1 στην άνω αριστερή γωνία. Βεβαιωθείτε πως όλα τα βοηθία είναι σωστά τοποθετημένα και βαθιά στις εγκοπές τους. Αριθμείστε κάθε σειρά για να αποφύγετε λάθη. Διατηρείστε την ίδια κατεύθυνση στην μικροπλάκα σε όλη την διάρκεια της εξέτασης.

15. Προσθέστε 50  $\mu\text{L}$  ευαισθητοποιημένα λυμένα κύτταρα, λυμένο θετικό και αρνητικό μάρτυρα στα ανάλογα μικροβυθίσματα σύμφωνα με τον πίνακα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Μην προσθέτετε δείγματα ή αντιδραστήρια στα βυθίσματα για «τυφλά».

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: ΒΑΛΤΕ ΕΤΙΚΕΤΕΣ ΣΕ ΚΑΘΕ ΤΑΙΝΙΑ ΠΡΟΣ ΑΠΟΦΥΓΗ ΛΑΘΩΝ.

16. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία κάλυψης πλακών και επώαστε για 30-35 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Εάν χρησιμοποιηθεί ξηρό επωαστικό, αυξήσατε τον χρόνο επώασης κατά 10 λεπτά.
17. Αραιώστε το Σύζευγμα με τον Διαλύτη Δείγματος με αναλογία 1 προς 100. Χρησιμοποιείστε το δοχείο πολυπροπυλενίου.

Ταινίες:	3 – 1 x 8	12 – 1 x 8
AG	20 µL	60 µL
TSD	2.0 mL	6.0 mL

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Το Σύζευγμα είναι ιζώδες. Εμβαπτίστε το ρύγχος στο Σύζευγμα πριν την διανομή και ξεβγάλατε μετά την πρόσθεση στον Διαλύτη Δείγματος. Ανακατέψτε καλά.

18. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 300 µL, Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 ή 4 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Είναι σημαντικό να αφαιρέσετε τελείως όλο το πλυστικό διάλυμα μετά την τελευταία πλύση.

19. Προσθέσατε 50 µL αραιωμένου Συζεύγματος (όπως αυτή έγινε σε προηγούμενο στάδιο) σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ από αυτά που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.
20. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία σφράγισης πλάκας και επώαστε επί 30-35 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Αν χρησιμοποιείται ξηρό επωαστήριο, αυξήστε τον χρόνο κατά 10 λεπτά.
21. Αραιώστε το Υπόστρωμα PNPP προσθέτοντας 0.5 mL αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό στο φιαλίδιο. Επανατοποθετείστε το Διάλυμα Διακοπής της Αντίδρασης (stopper), και ανακατέψτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.
22. Αραιώστε το PNPP με το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος σε αναλογία 1 προς 100.

Ταινίες:	3 – 1 x 8	12 – 1 x 8
PN	40 µL	120 µL
SB	4.0 mL	12.0 mL

Αναμείξτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.

23. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 300 µL, Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 ή 4 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

Προχωρήστε άμεσα στα επόμενα τρία στάδια.

24. Προσθέτετε 100 µL του αραιωμένου διαλύματος PNPP σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ αυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.
25. Αφήστε τα μικροβυθίσματα να σταθούν στο σκοτάδι επί 30 λεπτά σε ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (22-25°C).

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:** Ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασία μετά την πρόσθεση του PNPP είναι κρίσιμα. ΜΗΝ τροποποιήσετε τους προκαθορισμένους χρόνους επώασης και την θερμοκρασία. Για λόγους διατήρησης σταθερότητας, ξεκινήστε την χρονομέτρηση αμέσως μετά την πρόσθεση του αντιδραστηρίου στο πρώτο βύθισμα.

26. Διακόψτε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μL Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά με την οποία προσετέθη το υπόστρωμα. Προσθέστε 200 μL Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης στα τυφλά βυθίσματα.
27. Διαβάστε την απορρόφηση (ΟΠ) κάθε βυθίσματος στα 405 ή 410 nm χρησιμοποιώντας φίλτρο αναφοράς 490 nm. Εάν τα αποτελέσματα δεν μπορούν να διαβαστούν αμέσως επιστρέψτε τα βυθίσματα σε σκοτεινό μέρος και αφήστε τα να μείνουν έως και 30 λεπτά.
28. Αφαιρέστε τις αποκτηθείσες τιμές από τα τυφλά βυθίσματα από όλα τα βυθίσματα δειγμάτων και ορών ελέγχου. Πολλές συσκευές ELISA είναι προγραμματισμένες να διεκπεραιώνουν αυτό το στάδιο αυτόματα.
29. Καταγράψτε τα αποτελέσματα στο Φύλλο Καταγραφής Αποτελεσμάτων.

### **ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**

Ο ποιοτικός έλεγχος του MACE<sup>®</sup>2 είναι ενσωματωμένος στο σύστημα ανάλυσης με την συμπερίληψη των Αρνητικού και Θετικού Ορών Ελέγχου. Αυτοί οι οροί ελέγχου πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε τεστ εξέταση προκειμένου να προσδιορίζονται τυχόν τεχνικά λάθη και λάθη αντιδραστηρίων.

Κριτήρια αξιόπιστης εξέτασης:

	Αρνητικός ορός Ελέγχου	Θετικός ορός Ελέγχου
Μέσος όρος OD (ΟΠ= Οπτική Πυκνότητα)	≤ 0.100 (GrIV στήλη)	≥ 0.900 (GrIV στήλη)

### **ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Αποτελέσματα δειγμάτων με ίσες ή μεγαλύτερες από 2X της τιμής OD του αρνητικού Ορού ελέγχου της ανάλογης γλυκοπρωτεΐνης, θεωρούνται θετικά.

### **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

Τα λανθασμένα αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από βακτηριακή μόλυνση των υλικών της εξέτασης, ανεπαρκείς χρόνους επώασης, ανεπαρκείς ή πλημμελείς πλύσεις των υπό εξέταση βυθισμάτων ή των προς εξέταση αιμοπεταλίων, έκθεση του υποστρώματος σε απ' ευθείας φως, έκθεση σε υψηλότερες ή χαμηλότερες από τις συνιστώμενες θερμοκρασίες, ή παράλειψη κάποιου σταδίου.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση μιας κλινικής απόφασης.

Κάποιοι χαμηλοί τίτλοι, χαμηλής ζωτικότητας αντισώματα μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με την χρήση αυτής της ανάλυσης.

Αυτό το προϊόν δεν ανιχνεύει IgM ή IgA αντισώματα, ή αντισώματα σε γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων άλλες των Ia/IIa, Ib/IX, και GPIV.

In vivo ευαισθητοποιημένα αιμοπετάλια δεν έχουν ελεγχθεί με αυτό το προϊόν.

### **ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

Όταν αποθηκεύεται και χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις ως άνω οδηγίες, αυτό το προϊόν μπορεί να αντισώματα IgG αντιδρώντα με γλυκοπρωτεΐνες GPIb/IX, GPIa/IIa, ή GPIV.

Προκειμένου να διασφαλιστεί η κατάλληλη αντιδραστικότητα και ειδικότητα, κάθε παρτίδα MACE<sup>®</sup>2 εξετάζεται πριν κυκλοφορήσει με δείγματα περιέχοντα αντισώματα Αντιδρώντα με τις γλυκοπρωτεΐνες τις περιγραφόμενες στο Φύλλο Καταγραφής Καθώς και δείγματα για τα οποία ξέρουμε ότι είναι ελεύθερα τέτοιων αντισωμάτων.

## Αξιολόγηση Απόδοσης

MACE <sup>®</sup> 2		Συγκριτική μέθοδος		Σύνολο
		Θετικό	Αρνητικό	
	Θετικό	8	6	14
	Αρνητικό	1	132	133
	Σύνολο	9	138	147

Συμφωνία: 95.2%

Συν-θετικότητα: 88.9%      Συν-αρνητικότητα: 95.6%

Συγκριτική μέθοδος: GTI-PAK<sup>®</sup>2

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunization to platelets. *Transfusion* 1978; **18**: 496
2. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiemik PH. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of dose-response relationship. *Blood* 1981; **57**: 395
3. Schiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar on antigens on blood cells and body fluids. Washington DC: American Association of Blood Banks; 1980: 189-208
4. Kunicki TJ, Aster RH: Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen PI(A1). *Mol Immunol* 1979; **16**: 353
5. Friedman JM, Aster RH: Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura and congenital porencephaly in two siblings associated with a Anew<sup>®</sup> maternal antiplatelet antibody. *Blood* 1985; **65**: 1412
6. Furihata K, Nugent DJ, Aster RH, Kunicki TJ: Anti-Pen(a) binds specifically to an epitope on platelet glycoprotein IIIa. *Blood* 1986; **68**: 107, (suppl 1) (abstr).
7. Simon T, Collins J, Kunicki T, Furihata K, Smith K, Aster RH: Post-transfusion purpura with antiplatelet antibody specific for the platelet antigen Pen<sup>a</sup>. *Blood* 1986; **68**: 117 (abstract)
8. Woods VL, Oh EH, Mason D, McMillan R: Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* 1984; **63**: 368
9. McMillan R, et al. *Blood* 1987; **70**: 1040-1045



**GTI DIAGNOSTICS<sup>®</sup>**

Good science starts with people.<sup>®</sup>

**MACE<sup>®</sup>2**

- ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
- ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΕ 2-8°C

20925 Crossroads Circle, Suite 200  
Waukesha, WI 53186-4054 USA  
(262) 754-1000 ή 1-800-233-1843

REF MACE2

Αναθεωρήθηκε 2008-03-18 (Gr)



Qarad b.v.b.a.  
Volmolenheide 13  
B-2400 Mol  
Belgium

