

PAK[®]12

PÅTÆNKET FORBRUG

PAK[®]12 er en kvalitativ fastfase enzymforbundet immunosorbent prøve (ELISA) der er konstrueret til at påvise antistoffer til HLA Klasse I og til epitoder på blod plader glycoproteinerne IIb/IIIa, Ia/IIa, Ib/IX.

Til *In Vitro* diagnostisk brug.

SAMMENDRAG OG FORKLARING

Blod plader-specifikke antistoffer på forskellige glycoproteiner er blevet beskrevet af mange forskere.^{1,2,3,4,5,6} Antistoffer til blod plader-specifikke eller HLA class I antigener opstået på baggrund af graviditet eller blodtransfusion kan resultere i immun destruktion af transfunderet blod plader.^{6,7,8} Påvisning af disse antistoffer i patienters serum kan hjælpe i søgen efter forenelige blodprodukter.

PAK[®]12 fast fase ELISA microwells giver monoclonal-fanget platelet glycoprotein IIb/IIIa og Ia/IIa der kommer fra blod gruppe O donorer med kendte blod plader phenotyper. HLA class I og blod plader glycoprotein Ib/IX er fremsat som affinitet rensede glycoproteiner. Prøven er beregnet til at påvise og klassificere antistoffer til HLA class I og blod plader -specifikke antistoffer. Indstilling af alle microwells strimlerne kan ses på resultat skemaet.

PRINCIPPET

Patientens serum eller plasma er tilsat microwells strimler som er imprægneret med blod plader og HLA glycoproteiner og tillader antistoffer, hvis de er tilstede, at binde sig. Antistoffer, der ikke er bundet, bliver vasket væk. En base phosphatase markeret anti-menneskeligt globulin reagens, (Anti-IgG/A/M), er tilsat microwells strimlerne og inkuberet. Antistoffer, der ikke er bundet, bliver vasket væk og substrat PNPP (p-nitrophenyl phosphate) er tilsat. Efter 30 minutters inkubationsperiode, vil reaktionen være stoppet af natriumhydroxid opløsning. Den optiske farvetæthed, der fremkaldes, måles ved hjælp af et spektrofotometer.

REAGENSERNE

Maksimalt antal prøver pr. kit: 5

Alle reagenserne skal opbevares som beskrevet på skemaet.

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Microwells: Flad-bundet microwells strimmel til hvilket blod plader og HLA glycoproteinerne er fastsat. Microwells strimlerne er opbevaret i genoplukkelige folieposer. Klar til brug. |
| TCW | 2. Koncentreret Vask (10x): Tris (hydroxymethyl) aminomethane bufferet væske indeholder natriumchlorid og Tween 20. 1% natriumazid. Fortynd med deioniseret eller destilleret vand før brug. Opbevar den fortyndede Vaske opløsning op til 48 timer ved stuetemperature eller op til syv dage ved 2 til 8°C. |
| SD | 3. Prøve fortyndingsvæske: Phosphat bufferet saltopløsning indeholder bovine albumin og muse-serum. Klar til brug. |
| SB | 4. Substrat Buffer: Denne opløsning indeholder diethanolamin og magnesiumchlorid. 0.02% natriumazid. Klar til brug.. Beskyt mod lys. |
| SS | 5. Stopopløsningen: 3 M Natriumhydroxid Klar til brug. Brug med forsigtighed. |
| AH | 6. Konjugate: Alkaline phosphatase konjugated ged affinitet ægte antistoffer til menneskeligt immunoglobulin (IgG/A/M). 0.1% natriumazid. Fortynd i prøve fortyndingsvæsken før brug. |
| PN | 7. PNPP (p-nitrophenyl phosphate) Substrat: Krystallinsk pulver. Rehydrer med deioniseret eller destilleret vand og fortynd i Substrat Buffer før brug. Beskyt mod lys. |
| PC | 8. Positiv Serum Kontrol: Menneskeligt-serum. 0.1% sodium azide. Fortynd i prøve fortyndingsvæsken før brug. |

NC

9. Menneskeligt -serum. 0.1% sodium azide. Fortynd i prøve fortyndingsvæsken før brug.

PS

10. Plade Kapsel.

FORHOLDSREGLER

- Reagenser, der er uklare eller forurenede kan ikke bruges.
- Forsigtighed SKAL udvises så man undgår forurening af fortyndingsvæsken og Konjugate. Forurening af disse reagenser med menneskeligt serum eller plasma vil resultere i neutralisering af Konjugatet og derfor give et fejlbehæftet resultat (i prøven).
- Reagenserne må ikke bruges efter udløbsdatoen.
- Microwells strimlerne og reagenserne inkluderet i dette kit kan ikke bruges sammen med et andet kit eller afprøvet system.
- Brug af andre reagenser der ikke er inkluderet i dette kit kan give falske resultater.
- Ubenyttede portioner af det fortyndede Konjugate, fortyndede positive og negative kontrol tester, og det fortyndede og rehydrerede PNPP reagens kasseres efter hver prøve..
- Følg pipette fabrikantens instruktioner om korrekt brug og rensning af pipetten.
- Enzym substrat reaktionen foregår i den sidste inkubation. Den er temperaturfølsom og udføres i et kontrolleret område fra 22 til 25°C.
- Da der er temperaturvariationer i instrumenter og rum (eller variationer i de højere eller lavere stuetemperaturer,) kan det blive nødvendigt for laboratoriet at etablere en længere eller kortere inkubationstid, for at opnå gyldige kontrolresultater. Da temperaturen af den sidste inkubation kan påvirke kontrolværdierne er det vigtigt at kontrollere temperaturen jævnlige.

ADVARSEL

- Alt menneskeligt serum der bliver brugt for Positiv og Negativ Kontrol materiale (af dette produkt), er testet og fundet negativ for antistoffer til HIV, HCV og HBsAg med FDA godkendte metoder. Der findes ikke en test metode, der med sikkerhed kan garantere, at HIV, Hepatitis C virus, Hepatitis B virus eller andre smitsomme sygdomme, ikke er tilstede. Derfor skal disse reagenser behandles som værende smitsomme.
- Nogle af de inkluderede reagenser indeholder natriumazid som stabilisator.
ADVARSEL: Natriumazid reagerer med massive metaller som f.eks. kobber vandrør og kan danne eksplosive metal azider. Spildes materiale i vasken, skal den skylles med rigeligt vand, for at minimere muligheden for at azider reagerer med metaller. Natriumazid er meget giftigt ved indtagelse.
- Væsken (NaOH) er ætsende. Undgå øjen- og hudkontakt. Ved spild tørres der op med det samme.
- Bortskaffelse af brugte reagenser skal ske efter de lokale myndigheders regler.

PRØVETAGNING

Blod skal indsamles i ACD eller EDTA (Plasma) eller uden anticoagulant (Serum) ved brug af sterile metoder og skal testes, mens prøven er frisk, så man kan minimere muligheden for at få falske positiv eller falske negativ reaktioner, fordi opbevaringen var forkert eller prøven var kontamineret. Prøver der ikke kan blive tested med det samme skal opbevares ved 2 til 8°C i op til 48 timer eller fryses. Prøver der er frosset ved -20°C eller koldere kan opbevares i flere år (2-3 år). Det er vigtigt at undgå at fryse/optø prøven gentagne gange. Det er bedst at fryse flere små prøver. Opbevares frosset.

Serum eller plasma bør adskilles fra de røde blodceller før det bliver opbevaret eller sendt.

Partikler eller aggregat i prøven kan give falske positiv resultater eller dårlige duplikate resultater. Prøver med partikler i skal centrifugeres, før testen begynder.

Kun menneskeligt serum eller plasma må bruges til denne prøve. Prøver der er fortyndet i andet end normale, ELISA negativ menneskeligt serum kan give falske resultater.

Microskobisk forurening, hemolyses, lipemic, icteric, eller wame-inaktiveret prøver vil give unøjagtige resultater og skal undgås.

PRØVE METODE

Inkluderet materiale:

Flaskerne kan indeholde mere af reagenset end beskrevet på etiketten. Reagenserne skal måles nøjagtigt med tilpassede instrumenter når fortyndinger er lavet.

1. 6 – 2 x 8 microwells strimler med ramme

2. 1 x 50 mL Koncentreret Vask
3. 1 x 14 mL Prøve fortyndingsvæske
4. 1 x 14 mL Substrat Buffer
5. 1 x 14 mL Stopopløsning
6. 1 x 80 µL Anti-menskeligt IgG/A/M Konjugat
7. 3 x 50 mg PNPP substrat
8. 1 x 0.3 mL Positiv Serum Kontrol
9. 1 x 0.7 mL Negativ Serum Kontrol
10. 6 Plade Kapsel

Andre Materialer der er nødvendige:

1. Prøver af patientens prøve og kontrol fortynding og af alle reagenserne der skal fortyndes.
2. Overførelsespipetter.
3. Indstillelige mikropipetter der afleverer mellem 10 – 100 µL og 100 – 1,000 µL og engangsbrug tipper.
4. Ur (Timer)
5. Microplade læser der kan måle OD at 405 eller 410 og 490 nm.
6. Deioniseret eller destilleret vand
7. Opsugende papir håndklæder
8. Microplade vasker eller apparatur
9. Centrifuge der kan adskille serum eller plasma fra patientens prøve
10. 37°C vandbad eller varmeskab

Prøve Fremgangsmåde

1. Bring alle reagenserne til stuetemperatur.
2. Forbered vaskeopløsningen ved at fortynde den koncentrerede vask. Tilsæt 1 mål af koncentreret vask til 9 mål af deioniseret eller destilleret vand. Bland godt.
3. Udregn antallet af patientprøver der skal testes. Brug resultatskemaet til at markere hver prøve til en position sådan at der er duplikate kolonner. Marker identiteten af hver prøve på resultat skemaet.

KLARGØR PRØVERNE OG KONTROL PRØVERNE

4. Fortynd som beskrevet og bland godt:

	Volume Specimen Diluent	Volume Prøve
Positiv Kontrol	150 µL	50 µL
Negativ Kontrol	600 µL	200 µL
Patientprøven	600 µL	200 µL

5. Udtag microwells rammen fra posen. Fjern pladen hurtigt og luk for folieposen med ubrugte teststrimler.

NB: Kun en (1) ramme er inkluderet i pakken. Gem rammen til alle strimler er brugt.

NB: Placer rammen med A1 i toppen af det venstre hjørne. For sikkerhed placere striperne sådan at de sætter rigtigt fast i rammer. Marker eller numre hver strimmel sådan at man forhindrer fejl i prøven. Placere rammen i den samme retning hele prøven igennem.

6. Tilsæt 300 µL af vaskeopløsningen til alle microwells tuberne og lad den forblive ved stuetemperatur i 5-10 minutter.
7. Aspirer eller dekanter energisk og læg omvendt på papir håndklædet, så man undgår udtørring af microwells strimlerne.
8. Tilfør 50µL af den rigtige kontrolprøve til tuberne som beskrevet på resultat skemaet.

NB: Prøver eller reagenser skal ikke tilsættes de blanke tuber.

NB: Hvis mere end en patient prøve er testet på samme tid, er kun et sæt kontroller nødvendigt. **MARKER ALLE TEST STRIMLER SÅ DER IKKE ER FEJL.**

9. Kappe microwells strimlerne med en plade kappe og inkuber i 30-35 minutter i et 37°C vandbad. Hvis en varmeovn er brugt, varm i yderligere 10 minutter.
10. Fortynd Konjugatet 1 til 100 med fortyndingsvæske. Brug en polypropylene tube.

Strips:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
AH	20 µL	60 µL
SD	2.0 mL	6.0 mL

NB: Konjugatet er tykflydende. Fyld spidsen 2-3 gange med Konjugatet før dispensering og rens med fortyndingsvæsken. Bland godt.

11. VASKE TRIN:

- Aspirer eller dekanter indholdet af hver tube in strimlerne og blot med sugende papir håndklæde.
- Tilsæt 300 µL vaskeopløsning.
- Aspirer eller dekanter.
- Gentag vasketrin b + c, 3 til 4 gange.
- Dekanter energisk for at fjerne alt vaskevæsken. Vend og læg pladen på et sugende papir håndklæde for at beskytte pladen fra at udtørre.

NB: Det er vigtigt at fjerne alt vaske væsken efter den sidste vask.

12. Tilsæt 50 µL af den fortyndede konjugat (forberedt i det sidste trin) til alle tuberne med UNDTAGELSE af de BLANKE tuber.
13. Luk microwells strimlerne med plade kapslen og inkuber i 30-35 minutter i et 37°C vandbad. Hvis en varmeovn er brugt, forøges inkubationstiden med 10 minutter.
14. Opløs PNPP Substrat ved at tilsætte 0.5 ml deioniseret eller destilleret vand til beholderen. Sæt låget på og bland godt. Beskyt mod lyset før brug.
15. Opløs PNPP'en 1 til 100 i Substrat Buffer.

Strips:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
PN	40 µL	1200 µL
SB	4.0 mL	12.0 mL

Bland godt. Beskyt mod lyset, indtil det bliver brugt.

16. VASKE TRINET:

- Aspirer eller dekanter indholdet af hver tube på pladen og blot med sugende papir håndklæde.
- Tilsæt 300 µL vaskeopløsning.
- Aspirer eller dekanter.
- Gentag vasketrin b + c, 3 til 4 gange.
- Dekanter energisk for at fjerne alt vaskevæsken. Vend og læg pladen på et sugende papir håndklæde for at beskytte pladen fra at udtørre.

Forsæt hurtigt med de næste 3 trin.

17. Tilsæt 100 µL af den fortyndede PNPP væske til alle microwells strimlerne med UNDTAGELSE af de BLANKE tuber.
18. Lad microwells strimlerne stå et mørkt sted i 30 minutter ved STUETEMPERATUR (22 til 25°C).

NB: Inkubationstid og temperatur efter tilsætning af PNPP er kritisk. ÆNDRE ikke den fastsatte inkubationstid eller temperatur. Sæt stoptiden efter at reagenserne er tilsat til den **første** microwells tube.

19. Stop reaktionerne ved at tilsætte 100 µL af stopopløsningen til hver tube i samme orden som substratet blev tilsat. Tilsæt 200 µL af stopopløsningen til de blanke tube.
20. Læs absorbance værdier (OD) af hver tube ved 405 eller 410 nm og brug et reference filter af 490 nm. Hvis resultaterne ikke kan læses med det samme, læg pladen tilbage i mørket i op til 30 minutter.

21. Fratræk værdien af de blanke tuber fra alle prøverne og kontrolluberne. Mange ELISA instrumenter er programmeret til automatisk at udføre dette trin.

22. Overfør resultaterne til resultatskemaet.

KVALITETSKONTROL

Kvalitetskontrol af PAK[®]1 er indbygget i prøvesystemet ved brug af Positiv og Negativ Serum Kontroller. Disse kontroller skal inkluderes i hver prøve for at afsløre om der er tekniske problemer, om reagenserne har fejlslag, eller hvis der er problemer med prøven.

Kriterium for en korrekt prøve:

	Negativ Kontrol	Positiv Kontrol
Gennemsnit OD	≤ 0.175	≥ 1.000

OD resultaterne fra di 2 prøve tuber skal falde imellem 20% af gennemsnittet af de to (2) værdier. Prøver som har resultater uden for disse grænser skal testes igen.

NB: Dårlig duplikering af de to prøver kan være et resultat af dårlige reagenser eller patientens prøve. Ujævn tilsætning af reagenserne, ujævn temperatur i inkubationstiden, lys i den sidste inkubation eller krydskontamination. Prøver der ikke er duplikeret kan lede til fejlagtige resultater.

FORSTÅELSE AF RESULTATERNE

Resultater der viser OD værdier der er optil eller højere end 2X værdien opnået fra gennemsnittet af de negativ kontroller fra den tilsvarende glycoproteiner (2 negative kontrol værdier for hver glycoprotein).

BEGRÆNSNING

Fejlagtige resultater kan forekomme fra bakteriekontamination af prøvematerialet, unøjagtighed i inkubationstiden, unøjagtig vask eller dekantering fra prøve tuberne, substrat udsat for lys, forglemmelse af tilsætning af reagenser, udsættelse for højere eller lavere stuetemperatur end dem som er beskrevet, eller forglemmelse af trin i den beskrevne fremgangsmåde.

Tilstedeværelse af immunkomplekser eller andre immunoglobulinpartikler i patientens prøve kan give "ikke-specifikke" inbinding og give falsk-positiv resultater med denne prøve.

Resultater der ikke passer til et bestemt mønster af en HLA allo-modstof er udbestemt. Det er best at optage nye Blod prøver og/eller køre prøven igen, eller bruge en anden metode som GTI MACE[®] eller MAIPA.

Resultatet af denne prøve må ikke bruges som den eneste basis for en klinisk bestemmelse.

Nogle lav titer, lav aviditet antistoffer kan ikke opfanges med denne prøve.

Antistoffer til blod plader-specifikke antigener som ikke er fundet på resultatskemaet kan ikke blive påvises.

Tilstedeværelse af andre blod plader antigener der er fundet på GPIIb/IIIa som HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) og HPA-8b (Sr^a), er ikke vurderet for de blod plader der er bundet i GPIIb/IIIa wells. Det er muligt at der er alloantistoffer til disse systemer, der kan reagere med denne prøve.

Antistoffer til lav forekomst HLA klasse I antigener kan ikke påvises ved hjælp af dette produkt.

Nogle ikke-cytotoksiske HLA-antistoffer kan påvises ved denne teknik, der ikke reagerer på lymphocytotoxicity analyse (LCA).

SPECIFIK OPFØRELSESKARAKTERISTIK

Hvis opbevaret og brugt som beskrevet i proceduren ovenfor, kan dette produkt opfange antistoffer til HLA Klasse I og platelet-specifikke antigener som beskrevet på resultat skemaet.

Til at sikre passende reaktion eller specificitet, er hvert lot af PAK[®]12 før udsendelse tested med prøver som har reageret med glycoproteiner der er beskrevet på resultat skemaet.

Opfølgende vurdering

Sammelnende Metode

PAK [®] 12		Positiv	Negativ	Total
	Positiv	97	5	102
	Negativ	13*	266	279
	Total	110	271	381

Overensstemmelse: 95.3%

Co-positivitet: 88.2% Co-negativitet: 98.2%

Sammenligningsmetode: RPHA = Reverse Passive Hemagglutinations Prøve

* Fordi den sammenlignende metode omfatter hele, intakte blod plader som mål for antistof, kan det give positiv resultater med et antigen udtrykt på blod plader.¹⁰ Målene for antistof i PAK[®] 12 er den enkelte glycoproteiner, og dermed vil ikke afsløre koldt agglutinin eller antistoffer mod røde blodlegemer antigener såsom Lewis.

BIOGRAFI

1. Kunicki TJ, Aster RH. Isolationogimmunologic characterization of the human platelet isoantigen Pl(A1). Mol Immunol 1979; 16:353.
2. Van der Schoot, et al. Characterization of platelet-specific alloantigens by Immunoblotting: localization of ZwogBak antigens. Brit. J. Haemat. 1986; 64:715-723.
3. Kuijpers, R. W. A. M. et al. Localization of the platelet-specific Ko-system antigen Ko^a/Ko^b in GP Ib/IX. Blood 1989; 74: Suppl. I, 226a.
4. Kieffer, N. et al. Immunochemical characterization of the platelet-specific alloantigen Lek^a, a comparative study with the Pl^{A1} alloantigen. Blood 1984; 64: 1212-1219.
5. Furihata, K. et al. On the association of platelet-specific alloantigen with glycoprotein IIIa. J. Clin. Invest. 1987; 80:1624-1630.
6. Kiefel, V. et al. The Br(a)/Br(b) alloantigen systems on platelets. 1989; Blood 73:2219-2223.
7. Howard JE, Perkins HA. The natural history of allo immunization to platelets. Transfusion 1978; 18:496.
8. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. Blood 1981; 57:395.
9. Schiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar on antigens on blood cellsogbody fluids. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980; 189-208.
10. Garratty G. Review: Platelet immunology – similarities and differences with red cell immunology, 1995. Immunohematology 11 No 4: 113-4.

U.S. Patent #5,514,557



GTI DIAGNOSTICS

Good science starts with people.

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

REF PAK12

Rev. 2007-06-27 (D)



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

PAK[®]12

- TIL IN VITRO DIAGNOSTISK BRUG
- OPBEVARE AT 2 til 8°C



www.gtidiagnostics.com