PAK®12

Gebrauchsanleitung

PAK®12 ist ein qualitativer Festphasenenzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen HLA Klass I Antigene und von Antikörpern gegen spezifische Thrombozytenglykoproteine IIb/IIIa, Ia/IIa, und Ib/IX.

Zum in-vitro Gebrauch.

Zusammenfassung und Erläuterungen

Die Existenz von Thrombozyten spezifischen Antigenen auf der Oberfläche verschiedener Thrombozytenglykoproteine wurde in vielen Untersuchungen beschrieben.[1,2,3,4,5,6]
Antikörper gegen Thrombozyten spezifische oder HLA Klasse I Antigene nach Schwangerschaft oder Transfusion können aus der immunen Zerstörung transfundierter Thrombozyten resultieren.[7,8,9] Die Bestätigung der Anwesenheit dieser Antikörper in Patientenseren hilft bei der Suche nach geeigneten Blutprodukten.

PAK®12 ist ein Festphasenenzymimmunoassay, der nach der "Antigen-Capture" Methode aufgebaut ist. Die Vertiefungen der Teststreifen sind mit Thrombozytenglykoproteinen IIb/IIIa und Ia/IIa von Spendern der Blutgruppe 0 mit bekannten Thrombozyten-Phänotypen beschichtet und werden von spezifischen monoklonalen Antikörpern an die feste Phase gebunden werden. HLA Klasse I und Thrombozytenglykopoteine Ib/IX werden direkt beschichtet. Der Test dient dem Nachweis und der Differenzierung von Antikörpern gegen HLA Klasse I und Thrombozyten spezifischen Antigenen. Entnehmen Sie die Beschichtung der Vertiefungen dem Protokollbogen/Recording Sheet.

Testprinzip

Patientenserum oder Patientenplasma wird in die Vertiefungen, die mit Thrombozyten und HLA Glykoproteinen beschichtet sind, pipettiert. Spezifische Antikörper in der Patientenprobe binden an diese Festphasenantigene. Nach einem Waschschritt, bei dem alle nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Human IgG/A/M zugefügt. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe des chromogenen Substrats PNPP entsteht eine Farbreaktion, die nach 30 Minuten mit einer 3 M NaOH-Lösung abgestoppt und photometrisch ausgewertet wird**.**

Reagenzien

Maximale Anzahl an Bestimmungen pro Testpackung: 5
Lagern Sie die Reagenzien wie auf dem Label angegeben.

MS 1. Mikrowells: die Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit Thrombozyten- und HLA Glykoproteinen. Die Teststreifen sind in einem wieder verschließbaren Beutel eingeschweißt. Gebrauchsfertig.

TCW 2. Waschlösungskonzentrat (10 x konzentriert): TRIS –Aminomethan gepufferte Lösung mit Na- Cl_2 und TWEEN 20; enthält 1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnen. Diese Waschlösung kann bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 7 Tagen bei 2-8°C gelagert werden.

SD 3. Probenverdünnungspuffer: Phosphat gepufferte saline Lösung mit Rinderalbumin und Mausserum; enhält 0,1% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig.

SB 4. Substratpuffer: enthält Diethanolamin, $MgCl_2$ und 0,02% Natrium- Azid. Gebrauchsfertig. Dunkel aufbewahren.

SS 5. Stopplösung: 3 M NaOH. Gebrauchsfertig. Mit Vorsicht verwenden!

AH 6. Konjugat: ein mit alkalischer Phosphatase markierter gereinigter Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen humanes (IgG/A/M); enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.

PN 7. PNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat, kristallin. In destilliertem Wasser auflösen und vor Gebrauch mit Substratpuffer verdünnen. Dunkel aufbewahren,

PC 8. Positives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.

NC	9. Negatives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.
PS	10. Abklebefolien.

Vorsichtsmaßnahmen

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Vermeiden Sie jede Kontaminationen des Verdünnungspuffers und des Konjugats. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Serum oder Plasma führt zur Neutralisation des Konjugats und damit zum Testausfall.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die verdünnten Konjugate, Kontrollen und Substrate.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Die enzymatische Substratreaktion im letzten Inkubationsschritt ist Temperatur abhängig und sollte bei 22-25°C durchgeführt werden.
- Durch Abweichungen bei den verwendeten Materialen und Geräten und durch Temperatur-unterschiede in den Laboratorien kann es sinnvoll sein, die abschließende Inkubationszeit leicht zu erhöhen bzw. zu verringern, um die korrekten Werte für die Kontrollen zu erreichen. Kontrollieren Sie diese Anpassung regelmäßig.

Warnhinweis

- Alle Kontrollen humanen Ursprungs werden auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HB_s-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Einigen Reagenzien ist Natrium-Azid als Konservierungmittel zugesetzt. Bei Kontakt bitte mit reichlich Wasser spülen. Natrium-Azid ist ein Gift und wirkt im Körper toxisch.
- Die Stopplösung (NaOH) wirkt korrosiv. Vermeiden Sie deshalb jeden Kontakt mit der Haut und den Augen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

Probengewinnung

Entnehmen Sie das Blut in ACD oder EDTA (Plasma) oder ohne Zusatz von Antikoagulantien (Serum) unter den üblichen aseptischen Bedingungen und verwenden Sie es möglichst frisch, um falsch positive oder negative Ergebnisse durch zu lange Lagerung oder Kontamination der Probe auszuschließen. Proben, die nicht sofort abgearbeitet werden können, sollten bei 2-8°C bis zu 48 Std. aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung (> 48 Stunden) sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. Lagern Sie die Proben nicht in “No-Frost Gefrierschränken”!

Trennen Sie das Serum oder Plasma für die Lagerung oder den Versand von den übrigen Blutbestandteilen.

Partikel oder Ausflockungen in der Probe können zu falsch positiven Ergebnissen oder zu schlechten Doppelbestimmungen führen. Zenrifugieren Sie diese Proben vor ihrer Austestung.

Verwenden Sie ausschließlich humanes Serum oder Plasma für diesen Test. Die Proben dürfen nicht vorverdünnt sein. Dieses führt zu falsch negativen Ergebnissen.

Keine bakteriell verunreinigten, hämolytischen, lipämischen, ikterischen oder Hitze inaktivierten Proben verwenden, um widersprüchliche Ergebnisse zu vermeiden.

Durchführung

Mitgelieferte Materialien:

Die Vials enthalten z.T. mehr Reagenz, als auf dem Label angegeben. Entnehmen Sie deshalb immer die benötigten Mengen für dieVerdünnungen mit kalibrierten Pipetten.

1. 6 – 2 x 8 Teststreifen in einem Halterahmen
2. 1 x 50 ml Waschlösungskonzentrat

3. 1 x 14 ml Probenverdünnungspuffer
4. 1 x 14 ml Substratpuffer
5. 1 x 14 ml Stopplösung
6. 1 x 80 µl Anti-Human IgG/A/M Konjugat
7. 3 x 50 mg PNPP Substrat
8. 1 x 0.3 ml positives Kontrollserum
9. 1 x 0.7 ml negatives Kontrollserum
10. 6 Abklebefolien

Zusätzlich benötigte Materialien:

1. Röhrchen für die Verdünnungen der Proben, Kontrollen und Reagenzien
2. Transferpipetten
3. Variable Pipetten: 10-100 µl und 100-1000 µl und Einwegspitzen
4. Laborwecker
5. ELISA- Reader mit einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm
6. Destilliertes Wasser
7. Papiertücher
8. ELISA-Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. Wasserbad bei 37°C oder Brutschrank

Testdurchführung

1. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur.

2. Stellen Sie die benötigte Waschlösung her, indem Sie das Waschlösungskonzentrat 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen und gut mischen.

3. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Proben fest. Weisen Sie mit Hilfe des Protokollbogen/ Recording Sheet jeder Probe ihre Positionen (2 Doppelstreifen je Probe) zu.

Vorbereitung der Proben und Kontrollen

4. Verdünnen Sie wie angegeben und mischen Sie gut durch:

	Volumen Probenverdünnungspuffer	Volumen Probe
PC	150 µl	50 µl
NC	600 µl	200 µl
Patientenprobe	600 µl	200 µl

5. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen aus der Verpackung und verschließen Sie den Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort nach Entnahme.

Hinweis: Jede Testpackung enthält nur ein Halterahmen. Heben Sie den Rahmen für weitere Tests auf.

Hinweis: Positionieren Sie den Rahmen so, dass die Vertiefung A1 oben links ist. Kontrollieren Sie den richtigen Sitz und das Einrasten der Streifen im Rahmen. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechselungen auszuschließen. Behalten Sie diese Positionierung während der Testdurchführung bei.

6. Geben Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung und lassen Sie alles bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten stehen.

7. Verwerfen Sie den Inhalt und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

8. Pipettieren Sie 50 µl der verdünten Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen (siehe Protokollbogen).

Hinweis: Die Blank-Vertiefungen bleiben leer.

Hinweis: Werden pro Testansatz mehrere Patientenproben untersucht, sind die Kontrollen nur einmal erforderlich. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechselungen auszuschließen.

9. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

10. Verdünnen Sie das Konjugat 1:100 mit dem Probenverdünnungspuffer in einem Polypropylen Röhrchen, um Aktivitätsverluste des Konjugates auszuschließen.

Teststreifen:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
AH	20 µl	60 µl
SD	2.0 ml	6.0 ml

Hinweis: Das Konjugat ist sehr viskos. Ziehen Sie es deshalb vorsichtig auf und mischen Sie es im Probenverdünnungspuffer gut durch.

11. Waschschritte:

a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
b) Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
d) Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, daß nach dem lezten Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

12. Geben Sie 50 µl des verdünnten Konjugats in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Blanks.

13. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

14. Lösen Sie das kristalline PNPP-Substrat in 500 µl destilliertem Wasser auf und mischen Sie gut durch, indem Sie den Verschluß wieder einsetzen und das Vial gut schütteln. Bitte bis zur weiteren Verwendung vor Licht schützen.

15. Verdünnen Sie das PNPP 1:100 mit dem Substratpuffer.

Teststreifen:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
PN	40 µl	120 µl
SB	4.0 ml	12.0 ml

Gut mischen! Vor Licht schützen.

16. Waschschritte:

a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
b) Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
d) Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Arbeiten Sie die nächsten 3 Schritte genau ab.

17. Geben Sie 100 µl der verdünnten PNPP-Lösung in jede Vertiefung mit Ausnahme der Blanks.

18. Die Reaktionsansätze im Dunkeln exakt 30 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.

Hinweis: Die Inkubationszeit bzw. -temperatur nach Zugabe des PNNP ist kritisch. Halten Sie sie genau ein und starten Sie die Zeit mit der Zugabe des PNPP in die erste Vertiefung.

19. 100 µl Stopplösung in gleicher Abfolge wie das Substrat in alle Vertiefungen geben. Füllen Sie die Blanks mit zusätzlichen 100 µl Stopplösung auf.

20. Die Reaktionen werden nach dem Stoppen im ELISA-Reader bei 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm ausgewertet. Lassen Sie die Streifen im Dunkeln bis zu max. 30 Minuten stehen, wenn die Auswertung nicht sofort nach dem Abstoppen gemacht werden kann.

21. Ziehen Sie die Blank-OD Werte von den Proben und Kontrollen ab. Bei vielen ELISA-Readern läßt sich dieses programmieren.

22. Übertragen Sie Ihre Werte auf den Protokollbogen.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle des PAK®12 besteht aus dem Einsatz positiver und negativer Kontrollen, die bei jedem Ansatz mitgeführt werden, um die korrekte Durchführung und die Reaktivität der Regenzien zu bestätigen.

Kriterien für einen validen Test:

	Negative Kontrolle (IIb/IIIa Reihe)	Positive Kontrolle
OD Mittelwert	≤ 0.175	≥ 1.000

Die Doppelbestimmungen sollten nicht mehr als 20% abweichen. Alle Proben bzw. Kontrollen außerhalb dieses Bereiches sollten wiederholt werden.

Hinweis: Die Gründe für schlechte Doppelbestimmungen können vielfältig sein:
Fehler beim Pipettieren der Proben und Reagenzien, Fehler bei den Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, falsche Volumina oder Verschleppungen. Diese führt zu falschen Ergebnissen.

Interpretation der Ergebnisse

Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion (OD-Werte) der Probe gleich oder größer ist als das Doppelte des Mittelwerts der entsprechenden negativen Kontrolle.

Einschränkungen

Kontaminationen der Reagenzien, falsche Inkubationszeiten bzw. –temperaturen, unzureichendes Waschen und Ausklopfen der Vertiefungen, falsche Volumina, Streulicht bei der Substratinkubation, oder Auslassung von Schritten bei der Abarbeitung führen zu falschen Ergebnissen.

Das Vorhandensein von Immunkomplexen oder anderen Immunglobulin Aggregaten in der Patientenprobe kann zu unspezifischen Bindungen und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Testergebnisse, die nicht einem Muster einer Allo-Antikörperspezifität entsprechen, sollten als unklar bewertet werden. Diese Proben sollten neu entnommen und/oder nachgetestet werden oder mit einer anderen Testmethode, wie z.B. GTI MACE® oder MAIPA, getestet werden.

Alle Ergebnisse sollten immer mit weiteren serologischen Tests und dem klinischen Bild abgesichert werden.

Schwache Titer oder Antikörper geringer Avidität oder seltener Ausprägung werden u.U. nicht erfaßt und können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Autoantikörper gegen Thrombozyten spezifische Antigene, die auf dem Recording Sheet nicht aufgeführt sind, werden nicht erfaßt.

Andere Thrombozyten spezifische Antigene auf dem GPIIb/IIIa Komplex wie HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) und HPA-8b (Sr^a) wurden für den Captureschritt in den Vertiefungen mit GP IIb/IIIa nicht verwendet. Es ist aber möglich, daß Alloantikörper gegen diese Systeme im Test reagieren können.

Antikörper gegen seltene HLA Antigene werden im Test u.U. nicht erfaßt.

Einige nicht zytotoxische HLA-Antikörper, die im LCT nicht reaktiv sind, werden im ELISA erfaßt.

Spezifische Charakteristika der Durchführung

Bei korrekter Lagerung und Anwendung wie oben beschrieben dient dieser Test dem Nachweis von Antikörpern gegen HLA Klasse I Antigene und Thrombozyten spezifische Antigene wie auf dem beiliegenden Protokollbogen/Recording Sheet aufgeführt.
Um die Reaktivität und Spezifität zu garantieren, wird jede Charge des PAK®12 mit Proben, die Antikörper gegen die beschichteten Glykoproteine (siehe Protokollbogen) enthalten, getested wie auch mit Proben, die diese Antikörper nicht enthalten.

Evaluation

		Vergleichende Methode		
		Positiv	Negativ	Gesamt
PAK®12	Positiv	97	5	102
	Negativ	13*	266	279
	Gesamt	110	271	381

Übereinstimmung: 95.3%

Co-Positivität: 88.2% Co-Negativität: 98.2%

Vergleichende Methode: Reverse Passive Hemagglutination Assay

* Weil die vergleichende Methode ganze, intakte Thrombozyten als Zielantigen für den Antikörpernachweis vorsieht, sind positive Reaktionen mit anderen, auf der Thrombozytenoberfläche vorkommenden, Antigenen möglich.[10] Die Zielantigene für den Antikörpernachweis im PAK®12 sind die individuellen Glykoproteine und diese weisen weder Kälteagglutinine noch Antikörper gegen Erythrozytenantigene wie z.B. Lewis nach.

Referenzliteratur

1. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic 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 Zw and Bak 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 alloimmunization 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 cells and body 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.™

PAK®12
- **Zum in-vitro Gebrauch**
- **Lagerung bei 2-8°C**

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

CE

REF **PAK12**

Rev. 2007-06-27 (G)

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

www.gtidiagnostics.com