

AVSEDD ANVÄNDNING

PAK[®]12 är en kvalitativ enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) i fast fas, vilken är utformad för att detektera antikroppar mot HLA klass I-antigener och mot epitoper på trombocytglykoproteinerna IIb/IIIa, Ia/IIa och Ib/IX.

För *in vitro*-diagnostik.

KORTFATTAD FÖRKLARING

Förekomsten av trombocyt-specifika antigener på olika trombocytglykoproteiner har beskrivits av många forskare.^{1,2,3,4,5,6} Antikroppar mot trombocyt-specifika antigener eller HLA klass I-antigener på grund av graviditet eller transfusion kan leda till immunologisk destruktion av transfunderade trombocyter.^{7,8,9} Vid sökandet efter möjliga kompatibla blodprodukter kan det vara till hjälp att bekräfta förekomsten av dessa antikroppar i patientserum.

PAK[®]12 ELISA i fast fas har mikrobrunnar som tillhandahåller monoklonalt infångade trombocytglykoproteiner IIb/IIIa och Ia/IIa som erhållits från grupp O-donatorer av kända trombocyttyper. HLA klass I och trombocytglykoprotein Ib/IX tillhandahålls som affinitetsrenade glykoproteiner. Testet är utformat för att detektera och differentiera antikroppar mot HLA klass I-antigener och trombocyt-specifika antigener. Brunnarnas konfiguration finns på registreringsbladet.

METODPRINCIP

Patientens serum eller plasma tillsätts i mikrobrunnar som är belagda med trombocyt- och HLA-glykoproteiner, vilket gör det möjligt för antikroppar att binda om sådana förekommer. Obundna antikroppar tvättas därefter bort. Ett alkaliskt fosfatasmärkt anti-humant globulinreagens (anti-IgG/A/M) tillsätts i brunnarna och inkuberas. Obundet anti-IgG/A/M tvättas bort och substratet PNPP (p-nitrofenylfosfat) tillsätts. Efter 30 minuters inkubation stoppas reaktionen med en natriumhydroxidlösning. Den optiska densiteten hos den färg som utvecklas, mäts i en spektrofotometer.

REAGENSER

Maximalt antal tester per sats: 5

Alla reagenser ska förvaras enligt anvisningar på etiketten.

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Mikrobrunnar: Flatbottnade mikrobrunnarsremor på vilka trombocyt- och HLA-glykoproteiner har immobiliserats. Mikrobrunnarna ligger i en återförslutningsbar foliepåse. Klara att använda. |
| TCW | 2. Koncentrerad tvättlösning (10 x): Tris-(hydroximetil)-aminometanbuffrad lösning innehållande natriumklorid och Tween 20. 1 % natriumazid. Späd med avjoniserat eller destillerat vatten före användning. Förvara bruksfärdig tvättlösning i upp till 48 timmar vid rumstemperatur eller upp till sju dagar vid 2 till 8 °C. |
| SD | 3. Provspädningsmedel: Fosfatbuffrad natriumkloridlösning innehållande bovinalbumin och musserum. 0,1 % natriumazid. Klar att använda. |
| SB | 4. Substratbuffert: Denna lösning innehåller dietanolamin och magnesiumklorid. 0,02 % natriumazid. Klar att använda. Skyddas mot ljus. |
| SS | 5. Stopplösning: 3 M natriumhydroxid. Klar att använda. Används med försiktighet. |
| AH | 6. Konjugat: Alkaliskt fosfataskonjugerad affinitetsrenad getantikropp mot humana immunglobuliner (IgG/A/M). 0,1 % natriumazid. Späds i provspädningsmedel före användning. |
| PN | 7. PNPP (p-nitrofenylfosfat)-substrat: Kristallint pulver. Bereds med avjoniserat eller destillerat vatten och späds i substratbuffert före användning. Skyddas mot ljus. |
| PC | 8. Positiv serumkontroll: Humant serum. 0,1 % natriumazid. Späds i provspädningsmedel före användning. |

NC

9. Negativ serumkontroll: Humant serum. 0,1 % natriumazid. Späds i provspädningsmedel före användning.

PS

10. Plattförseglare:

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- Använd inte reagenser som är grumliga eller kontaminerade.
- Försiktighet **MÅSTE** iakttas för att undvika kontamination av provspädningsmedel och konjugat. Oavsiktlig kontamination av dessa reagenser med humant serum eller plasma medför neutralisering av konjugatet och därefter misslyckat test.
- Använd inte reagenser efter deras utgångsdatum.
- De mikrobrunnar och reagenser som ingår i satsen ska inte användas tillsammans med andra testsystem.
- Utbyte av komponenter till andra än de som tillhandahålls i denna sats kan leda till inkonsekventa eller felaktiga resultat.
- Kassera alla oanvända delar av utspätt konjugat, utspädda positiva och negativa kontroller, samt utspätt och berett PNPP-reagens efter varje körning.
- Vid spädningar, följ pipettillverkarens anvisningar för lämpliga dispenserings- och sköljtekniker.
- Enzymsubstratreaktionen som sker vid den slutliga inkubationen är temperaturkänslig och ska ske i ett kontrollerat utrymme vid 22 till 25 °C.
- På grund av variationer i instrumentet eller genomgående högre eller lägre rumstemperaturer, kan det vara nödvändigt att laboratoriet inför en något längre eller kortare inkubationstid för att genomgående uppnå giltiga kontrollresultat. Eftersom temperaturen vid den slutliga inkubationen kan påverka kontrollvärdena, är det viktigt att med jämna mellanrum kontrollera rumstemperaturinkubationen.

FÖRSIKTIGHET

- Allt humant serum som används i de positiva och negativa kontrollerna för denna produkt har testats och befunnits vara negativa för antikroppar mot HIV, HCV och HBsAg med metoder som godkänts av FDA. Ingen testmetod kan dock ge fullständig garanti för att det inte finns HIV, hepatit C-virus, hepatit B-virus eller andra smittämnen. Därför ska dessa material hanteras som potentiellt smittsamma.
- En del av de reagenser som levereras med denna sats innehåller natriumazid som konserveringsmedel.
WARNING: Natriumazid reagerar med bly- och kopparrör och bildar kraftigt explosiva metallazider. Om det kastas ut i en vask, ska vasken spolras med stora mängder vatten för att förhindra azidackumulering. Natriumazid är ett gift och är giftigt om det förtärs.
- Stopplösningen (NaOH) är frätande. Undvik kontakt med hud och ögon. Spill ska omedelbart torkas upp.
- Kassera alla komponenter i enlighet med lokala föreskrifter när analysen är avslutad.

PROVTAGNING

Blod ska samlas in i ACD eller EDTA (plasma) eller utan antikoagulans (serum) med hjälp av aseptisk teknik och ska testas medan det är färskt för att minimera risken för att få falska positiva eller falska negativa reaktioner på grund av olämplig förvaring eller kontamination av provet. Prover som inte kan testas omedelbart ska förvaras vid 2 till 8 °C i högst 48 timmar eller frysas. Prover som fryses vid -20 °C eller lägre håller sig bra i flera år (2–3 år). För att undvika den skadliga effekten av upprepade frysnings-/upptinningscykler, rekommenderas dock att prover delas upp i små volymer och därefter förvaras frysta. Undvik frostfria frysar.

Serum eller plasma ska separeras från röda blodkroppar om de ska förvaras eller skickas.

Partiklar eller aggregat i proverna kan ge falskt positiva resultat eller dåliga kontrollvärden.

Prover som innehåller partiklar ska centrifugeras så att partiklarna avlägsnas före test.

Endast humant helserum eller plasma lämpar sig för denna analys. Föregående spädning av prover i något annat än normalt, ELISA-negativt humant serum kan påverka resultaten.

Mikrobiellt kontaminerade, hemolyserade, lipemiska, ikteriska eller värmeinaktiverade prover kan ge inkonsekventa testresultat och ska undvikas.

METOD

Ingående material:

Flaskorna kan innehålla mer reagens än vad som anges på etiketterna. Se till att mäta upp reagenset med lämplig mätutrustning vid spädning.

1. 6 – 2 x 8 mikrobrunnsremsor med hållare
2. 1 x 50 mL koncentrerad tvättlösning
3. 1 x 14 mL provspädningsmedel
4. 1 x 14 mL substratbuffert
5. 1 x 14 mL stopplösning
6. 1 x 80 µL anti-humant IgG/A/M-konjugat
7. 3 x 50 mg PNPP-substrat
8. 1 x 0,3 mL positiv serumkontroll
9. 1 x 0,7 mL negativ serumkontroll
10. 6 Plattförelglare

Ytterligare material som behövs:

1. Provrör för patientprov och kontrollspädningar och för reagensspädningar
2. Överföringspipetter
3. Inställningsbara mikropipetter som ger 10–100 µL och 100–1 000 µL, samt engångsspetsar
4. Tidur
5. Mikroplattsläsare som kan mäta OD vid 405 eller 410 och 490 nm
6. Avjoniserat eller destillerat vatten
7. Absorberande pappershanddukar
8. Mikroplattstvätt eller -apparat för
9. Centrifug som kan separera serum eller plasma från patientprover
10. 37 °C vattenbad eller inkubator

Testmetod

1. Låt alla reagenser uppnå rumstemperatur.
2. Gör bruksfärdig tvättlösning genom att späda koncentrerad tvättlösning. Tillsätt 1 del koncentrerad tvättlösning till 9 del avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda väl.
3. Beräkna antalet patientprover som ska testas. Använd registreringsbladet och tilldela varje prov en plats bestående av två (dubbla) kolumner. Registrera varje provs identitet på registreringsbladet.

BEREDA PROVER OCH KONTROLLER

4. Späd enligt följande och blanda väl:

	Volym av provspädningsmedel	Volym av prov
PC	150 µL	50 µL
NC	600 µL	200 µL
Patientprov	600 µL	200 µL

5. Ta ut mikrobrunnsramen ur påsen. Ta snabbt ut och återförslut remsor som inte behövs i skyddspåsen.

OBS: Endast en ram medföljer satsen. Kasseras inte förrän alla remsor har använts.

OBS: Orientera ramen med A1 i övre vänstra hörnet. Se till att alla remsor sitter ordentligt och har knäppts fast i sin ram. Märk eller numrera varje remsa för att undvika fel. Behåll samma plattorientering under hela analysen.

6. Tillsätt 300 µL av den bruksfärdiga tvättlösningen i alla brunnar och låt stå i rumstemperatur i 5–10 minuter.
7. Aspirera eller dekantera kraftfullt och vänd upp och ned på absorberande handduk för att förhindra torkning.
8. Tillsätt 50 µL av lämplig utspädd kontroll eller prov i brunnarna så som anges på registreringsbladet.

OBS: Tillsätt inte prover eller reagenser i blankbrunnar.

OBS: Om flera patientprover testas samtidigt, behövs endast en uppsättning kontroller. **MÄRK VARJE REMSA FÖR ATT UNDVIKA FEL.**

9. Försegla mikrobrunnarna med en plattförseglare och inkubera i 30–35 minuter i ett 37 °C vattenbad. Om en torr inkubator används istället, ökas tiden med 10 minuter.
10. Späd konjugatet 1 till 100 i provspädningsmedel. Använd en polypropenbehållare.

Remsor:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
AH	20 µL	60 µL
SD	2,0 mL	6,0 mL

OBS: Konjugatet är visköst. Fyll spetsen 2–3 gånger med konjugat före dispensering och skölj efter tillsättning till provspädningsmedel. Blanda väl.

11. TVÄTTSTEG:

- Aspirera eller dekantera innehållet i varje brunn och sug upp på absorberande handduk.
- Tillsätt 300 µL bruksfärdig tvättlösning.
- Aspirera eller dekantera.
- Upprepa steg b + c för totalt 3 eller 4 tvättar.
- Dekantera kraftigt för att avlägsna all resterande tvättlösning. Vänd upp och ned på handduk för att förhindra torkning.

OBS: Det är viktigt att avlägsna all tvättlösning helt efter den slutliga tvätten.

12. Tillsätt 50 µL av utspätt konjugat (gjort i ett tidigare steg) i alla brunnar UTOM de som utgör BLANKAR.
13. Försegla mikrobrunnarna med en plattförseglare och inkubera i 30–35 minuter i ett 37 °C vattenbad. Om en torr inkubator används istället, ökas tiden med 10 minuter.
14. Lös PNPP-substratet genom att tillsätta 0,5 mL avjoniserat eller destillerat vatten i flaskan. Sätt tillbaka proppen och blanda noggrant. Skyddas mot ljus tills det ska användas.
15. Späd PNPP 1 till 100 i substratbufferten.

Remsor:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
PN	40 µL	120 µL
SB	4,0 mL	12,0 mL

Blanda väl. Skyddas mot ljus tills det ska användas.

16. TVÄTTSTEG:

- Aspirera eller dekantera innehållet i varje brunn och sug upp på absorberande handduk.
- Tillsätt 300 µL bruksfärdig tvättlösning.
- Aspirera eller dekantera.
- Upprepa steg b + c för totalt 3 eller 4 tvättar.
- Dekantera kraftigt för att avlägsna all resterande tvättlösning. Vänd upp och ned på handduk för att förhindra torkning.

Fortsätt omgående med följande tre steg.

17. Tillsätt 100 µL av den utspädda PNPP-lösningen i alla brunnar UTOM de som utgör BLANKAR.
18. Låt mikrobrunnarna stå i mörker i 30 minuter vid RUMSTEMPERATUR (22–25°C).

OBS: Inkubationstiden och temperaturen efter tillsatsen av PNPP är kritisk. Ändra INTE fastställd inkubationstid eller temperatur. För konsekvensens skull, börja tidtagningen efter tillsats av reagens i första brunnen.

19. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 100 µL stopplösning till varje brunn i samma ordning som vid tillsats av substrat. Tillsätt 200 µL stopplösning till blankbrunnarna.
20. Avläs absorbansen (OD) för varje brunn vid 405 eller 410 nm genom att använda ett referensfilter på 490 nm. Om resultaten inte kan avläsas genast, sätt tillbaka brunnarna i ett mörkt utrymme i upp till 30 minuter.

21. Subtrahera de värden som erhålls i blankbrunnarna från alla prov- och kontrollbrunnar. Många ELISA-läsare är programmerade att automatiskt utföra detta steg.

22. Registrera resultaten på registreringsbladet.

KVALITETSKONTROLL

Kvalitetskontrollen i PAK[®]12 är inbyggd i testsystemet genom att inkludera positiva och negativa serumkontroller. Dessa kontroller ska inkluderas i varje test som körs för att hjälpa till att fastställa om tekniska fel eller reagensfel har inträffat.

Kriterier för ett giltigt test:

	Negativ kontroll (IIb/IIIa-rader)	Positiv kontroll
Genomsnittlig OD	≤ 0,175	≥ 1,000

OD-avläsningar som erhålls för dubbeltestresultat ska ligga inom 20 % av genomsnittet för de två värdena. Prover vars resultat ligger utanför denna gräns ska testas om.

OBS: Dåliga dubbeltestresultat kan vara en följd av utelämnat reagens eller prov, ojämn tillsats av reagenser, ojämn temperatur under inkubationer, läckljus under den slutliga inkubationen eller korskontamination mellan brunnar. Underlåtenhet att dubbeltesta kan leda till att felaktiga resultat godtas.

TOLKNING AV TESTRESULTAT

Testresultat som visar OD-värden som är lika höga eller högre än 2 gånger det värde som erhöles för genomsnittet av de negativa kontrollerna för motsvarande glykoprotein (2 negativa kontrollvärden för varje glykoprotein) anses vara positiva resultat.

BEGRÄNSNINGAR

Felaktiga resultat kan uppstå på grund av bakteriekontamination av testmaterial, otillräckliga inkubationstider, otillräcklig tvättning eller dekantering av testbrunnar, exponering av substrat för läckljus, överhoppade testreagenser, exponering för högre eller lägre temperaturer än föreskrivet eller överhoppade steg.

Förekomst av immunkomplex eller andra immunglobulinaggregat i patientprovet kan orsaka ökad ospecifik bindning och ge falskt positiva resultat i denna analys.

Testresultat som inte passar mönstret för alloantikroppsspecificitet anses obestämbara. Dessa prover kan tas på nytt och/eller testas på nytt, eller testas med en annan metod såsom GTI MACE[®] eller MAIPA.

Resultaten av denna analys ska inte användas som enda grund för ett kliniskt beslut.

Vissa antikroppar med låg titer och låg aviditet kan inte detekteras med denna analys.

Antikroppar mot trombocyt-specifika antigener som inte anges på registreringsbladet kan inte detekteras.

Förekomsten av andra trombocyt-specifika antigener som finns på GPIIb/IIIa såsom HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) och HPA-8b (Sr^a) har inte bestämts för de trombocyter som infångats i GPIIb/IIIa-brunnarna. Det är möjligt att alloantikroppar mot dessa system kan vara reaktiva med denna analys.

Antikroppar mot HLA klass I-antigener med låg förekomst kanske inte kan detekteras med hjälp av denna produkt.

Vissa icke-cytotoxiska HLA-antikroppar som inte reagerar i den lymfocytotoxiska analysen (LCA) kan detekteras med denna teknik.

SPECIFIKA PRESTANDAEGENSKAPER

Vid rätt förvaring och användning i enlighet med de metoder som beskrivs ovan, kan denna produkt detektera antikroppar mot HLA klass I-antigener och mot de trombocyt-specifika antigener som anges på registreringsbladet.

För att säkerställa reaktiviteten och specificiteten testas varje parti av PAK[®]12 innan det släpps ut med prover som man vet innehåller antikroppar som reagerar med de glykoproteiner som anges på bifogat registreringsblad, liksom prover som man vet saknar sådana antikroppar.

Utvärdering av prestanda

Jämförande metod

PAK [®] 12		Positiva	Negativa	Totalt
	Positiva	97	5	102
	Negativa	13*	266	279
	Totalt	110	271	381

Överensstämmelse: 95,3 %

Sampositivitet: 88,2 % Samnegativitet: 98,2 %

Jämförande metod: Omvänd passiv hemagglutinationsanalys

* Eftersom den jämförande metoden innehåller hela, intakta trombocyter som mål för antikroppsdetektion, kan den ge positiva resultat med alla antigen som presenteras på trombocyter.¹⁰ Målen för antikroppsdetektion i PAK[®]12 är de individuella glykoproteinerna och därför detekteras inte kalla agglutiner eller antikroppar mot röda blodkroppsantigener såsom Lewis.

REFERENSER

1. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen PI(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 PI^{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.

USA-patent nr 5 514 557



PAK[®]12

- FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTISK ANVÄNDNING
- FÖRVARAS VID 2-8 °C

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 (Sw)



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

www.gtidiagnostics.com