

PAK[®]1

PÅTÆNKET FORBRUG

PAK[®]1 er en kvalitativ fastfase enzymforbundet immunosorbent prøve (ELISA) der er konstrueret til at påvise platelet-specifikke antistoffer, der reagerer med epitoder på platelet glycoprotein IIb/IIIa.

Til *In Vitro* diagnostisk brug.

SAMMENDRAG OG FORKLARING

Platelet-specifikke antigener på forskellige glycoproteiner er blevet beskrevet af mange forskere.^{1,2,3,4,5} Antistoffer til platelet-specifikke antigener opstået på baggrund af graviditet eller transfusion kan resultere i immun destruktion af transfused platelets.^{6,7,8} Påvisning af disse antistoffer i patienters serum kan hjælpe i søgen efter forenelige blodprodukter.

PAK[®]1 fast fase ELISA microwells giver monoclonal-fanget platelet glycoprotein IIb/IIIa der kommer fra 3 grupper O blod donorer med kendte platelet phenotyper. Prøven er beregnet til at påvise og klassificere antistoffer til bestemte episoder på platelet glycoprotein IIb/IIIa. Indstilling af alle microwells kan ses på resultat skemaet.

PRINCIPPET

Patientens serum eller plasma er tilsat microwells, imprægneret med platelet glycoproteiner og tillader antistoffer, hvis de er tilstede, at binde sig. Antistoffer, der ikke er bundet, bliver vasket væk. En base phosphatase markeret anti-human globulin reagens, (Anti-IgG/A/M), er tilsat microwells og inkuberet. Antistoffer, der ikke er bundet, bliver vasket væk og substrat PNPP (p-nitrophenyl phosphate) er tilsat. Efter en 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 microwell strimmel til hvilket platelet glycoproteiner IIb/IIIa, er fastgjort. Microwell strimlerne er opbevaret i genoplukkelige folieposer. Klar til brug. |
| TCW | 2. Koncentreret Vask(10x): Tris (hydroxymethyl) aminomethane bufferet væske indeholder natriumchlorid and 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 to 8°C. |
| SD | 3. Prøve af fortyndingsvæske: Phosphat bufferet salinopløsning 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 human immunoglobulin (IgG/A/M). 0.1% natriumazid. Fortynd i prøve af 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: Human-serum. 0.1% sodium azide. Fortynd i prøve af fortyndingsvæsken før brug.. |
| NC | 9. Negativ Serum Kontrol: Human-serum. 0.1% sodium azide. Fortynd i prøve af fortyndingsvæsken før brug.. |

FORHOLDSREGLER

- Reagenser, der er uklare eller beregnede kan ikke bruges.
- Forsigtighed **SKAL** udvises så man undgår kontamination af fortyndingsvæsken og Konjugate. Kontamination af disse reagenser med human serum eller plasma vil resultere i neutralisering af Konjugatet og derfor give et fejlbehæftet resultat (i prøven).
- Reagenserne må ikke bruges efter udløbsdatoen.
- Microwells og reagenserne inkluderet i dette kit kan ikke blive brugt 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 kontroltests, 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 rumtemperaturer,) 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 humant serum der benyttet til Positive og Negative Kontrol (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 benyttede 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 positive eller falske negative reaktioner, fordi opbevaringen var forkert eller prøven var kontamineret. Prøver der ikke kan blive prøvet 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 forblive adskilt fra de røde blodceller før det bliver opbevaret eller sendt.

Partikler eller aggregat i prøven kan give falske positive resultater eller dårlige duplikate resultater. Prøver med partikler i skal centrifugeres, før prøven påbegyndes.

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

Microskobisk kontamination, 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. 3 - 2 x 8 Microwell Strimler med holder
2. 1 x 50 mL koncentreret Vask
3. 1 x 14 mL Prøve af fortyndingsvæske

4. 1 x 14 mL Substrat Buffer
5. 1 x 14 mL Stopopløsning
6. 1 x 80 µL Anti-Human 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 papirhåndklæder
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 rumtemperatur.
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 prøves. Brug resultatskemaet til at markere hver prøve til en position sådan at der er en column. 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	300 µL	100 µL
Patientprøven	300 µL	100 µL

5. Udtag microwell 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 stripe sådan at man forhindre fejl i prøven. Placere rammen i den samme retning hele prøven igennem.

6. Tilsæt 300 µL af vaskeopløsningen til alle microwells beholderene og lad den forblive ved rumtemperatur i 5-10 minutter.

7. Aspirer eller dekanter energisk og læg omvendt på papirhåndklædet, så man undgår udtørring af microwells.

8. Tilføj 50µL af den rigtige kontrolprøve til beholderne som beskrevet på resultat skemaet.

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

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

9. Kappe microwells 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 beholder.

Strips:	1 - 2 x 8	3 - 2 x 8
AH	10 µL	30 µL
SD	1.0 mL	3.0 mL

NB: Konjugatet er viskøst. Fyld spidsen 2-3 gange med Konjugatet før dispensering og rens med Prøve af fortyndingsvæske. Bland godt.

11. VASKE TRIN:

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

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

12. Tilsæt 50 µL af den fortyndede konjugat (forberedt i det sidste trin) til alle beholdere med UNDTAGELSE af de BLANKE beholdere.
13. Luk microwells 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 lys før brug.
15. Opløs PNPP'en 1 til 100 i Substrat Buffer.

Strips:	1 - 2 x 8	2 - 2 x 8
PN	20 µL	60 µL
SB	2.0 mL	6.0 mL

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

16. VASKE TRINET:

- Aspirer eller dekanter indholdet af hver beholder og blot med sugende papirhåndklæde.
- Tilsæt 300 µL vaskeopløsning.
- Aspirer eller dekanter.
- Gentag vasketrin b + c, 3 til 4 gange.
- Dekanter energisk for at fjerne al vaskevæsken. Vend og læg pladen på et sugende papirhåndklæde 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 beholdere med UNDTAGELSE af de BLANKE beholdere.
18. Lad microwells'ne stå et mørkt sted i 30 minutter ved RUMTEMPERATUR (22 til 25°C).

NB: Inkubationstid og temperatur efter tilsætning af PNPP er kritisk. ÆNDRE ikke den fastsatte inkubationstid eller temperatur. For konsistens, sæt stoptiden efter at reagenserne er tilsat til den **første** beholder.

19. Stop reaktionerne ved at tilsætte 100 µL af stopopløsningen til hver beholder i samme orden som substratet blev tilsat. Tilsæt 200 µL af stopopløsningen til de blanke beholdere.

20. Læs absorbance værdier (OD) af hver beholder ved 405 eller 410 nm og brug et reference filter af 490 nm. Hvis resultaterne ikke kan læses med det samme, læg prøven tilbage i mørket i op til 30 minutter.
21. Fratræk værdien af de blanke beholdere fra alle prøverne og kontroller beholderne. 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 and Negativ Serum Kontroller. Disse kontroller skal inkluderes i hver prøve for at afsløre om der er tekniske problemer eller om reagenserne har fejlslag, hvis der er problemer med prøven.

Kriterium for en korrekt prøve:

	Negativ Kontrol	Positiv Kontrol
Gennemsnit OD	≤ 0.175	≥ 1.000

OD læsningen der kommer ved at gennemgå prøven to gange skal falde imellem 20% af gennemsnittet af de to 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 negative kontroller fra den tilsvarende glycoprotein (2 negative kontrol værdier for hver glycoprotein).

BEGRÆNSNING

Fejlagtige resultater kan forekomme fra bakteriekontamination af prøvematerialet, unøjagtighed i inkubationstiden, unøjagtig vask eller dekantering fra prøvebeholder, substrat udsat for lys, forglemmelse af tilsætning af reagenser, udsættelse for højere eller lavere rumtemperatur end de der beskrevet, eller forglemmelse af den beskrevne fremgangsmåde.

Tilstedeværelse af immunkomplekser eller andre immunoglobulinpartikler i patientens prøve kan bevirke "ikke-specifik" indbinding og give falsk-positive 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 løbe prøven igen, eller bruge en anden metode som GTI MACE[®] or MAIPA.

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

Nogle lav titer, lav begærlighedsantistoffer kan ikke opfanges med denne prøve..

Antistoffer til platelet-specifik antigener som ikke er fundet på resultatskemaet kan ikke blive påvises.

Tilstedeværelse af andre platelet 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 platelets der er bundet i GPIIb/IIIa wells. Det er muligt at der er alloantistoffer til disse systemer, der kan reagere med denne prøve.

Antistoffer mod sjældne HLA klasse I antigener kan ikke med sikkerhed blive fundet med dette produkt.

SPECIFIK OPFØRELSESKARAKTERISTIK

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

Til at sikre passende reaktion eller specificering, er hvert portion af PAK[®] 1 før udsendelse afprøvet med prøver som har reageret med glycoproteiner der er identificeret på resultat skemaet.

Opfølgende vurdering

Sammelnende Metode

PAK [®] 1		Positiv	Negativ	Total
		Positiv	13	
	Negativ	1	195	196
	Total	14	196	210

Overensstemmelse: 99%

Co-positivitet: 92.9% Co-negativitet: 99.5%

Sammenligningsmetode: RPHA = Reverse Passive Hemagglutinations Prøve

BIOGRAFI

1. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen PI(A1). Mol Immunol 1979; 16:353.
2. Friedman JM, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura and congenital porencephaly in two siblings associated with a "new" maternal antiplatelet antibody. Blood 1985; 65:1412.
3. 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.).
4. Simon T, Collins J, Kunicki T, Furihata K, Smith K, Aster RH. Post-transfusion pupura with antiplatelet antibody specific for the platelet antigen Pen^a. Blood 1986; 68:117 (abstract).
5. 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.
6. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunization to platelets. Transfusion 1978; 18:496.
7. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. Blood 1981; 57:395.
8. 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.

U.S. Patent #5,514,557



GTi[®]DIAGNOSTICS

Good science starts with people.[™]

PAK[®]1

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

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



REF

PAK1

Rev. 2007-07-10- (D)



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

www.gtidiagnostics.com