

PAK[®]1

UTILISATIONS PRÉVUES

PAK[®]1 est un essai qualitatif par la méthode ÉLISA (enzyme linked immunosorbent assay) en phase solide conçu pour détecter des anticorps spécifiques de plaquettes réagissant avec des épitopes sur la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa.

Pour usage diagnostique in vitro.

SOMMAIRE ET EXPLICATION

L'existence d'antigènes spécifiques de plaquettes sur diverses glycoprotéines plaquettaires a été décrite par plusieurs investigateurs.^{1,2,3,4,5} Les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de plaquettes générés lors d'une grossesse ou d'une transfusion peuvent causer l'immuno-destruction des plaquettes transfusées.^{6,7,8} La confirmation de la présence de ces anticorps dans le sérum des patients peut aider la recherche de produits sanguins potentiellement compatibles.

Les micropuits ÉLISA en phase solide PAK[®]1 fournissent la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa, isolée par anticorps monoclonal et provenant de trois donneurs du groupe O de phénotype plaquettaire connu. Ce test est conçu pour détecter et définir des anticorps dirigés contre des épitopes précis présents sur la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa. La configuration des puits se trouve sur le tableau de résultats.

PRINCIPE

Le sérum ou le plasma est ajouté aux micropuits enrobés avec glycoprotéines plaquettaires permettant à l'anticorps, si présent, de se lier. Les anticorps non liés sont alors lavés. Un réactif anti-globuline humaine conjugué à la phosphatase alcaline (Anti-IgG/A/M) est ajouté aux puits et incubé. Les Anti-IgG/A/M non liés sont lavés et le substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate) est ajouté. Après une incubation de 30 minutes, la réaction est arrêtée par une solution d'hydroxide de sodium. La densité optique de la couleur qui se développe est mesurée au spectrophotomètre.

COMPOSITION DU COFFRET

Nombre maximal de tests par coffret: 5

Tous les réactifs doivent être entreposés selon les instructions indiquées sur l'étiquette.

- | | |
|------------|---|
| MS | 1. Micropuits: barrettes avec micropuits à fond plat auxquels sont attachés la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa. Les barrettes de micropuits sont incluses dans un sachet d'aluminium refermable. Prêt à l'emploi. |
| TCW | 2. Solution de lavage concentrée (10x): solution tamponnée de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane contenant du chlorure de sodium et du Tween 20. 0,1% d'azide de sodium. Diluer avec de l'eau déionisée ou distillée avant utilisation. Conserver la solution de lavage de travail jusqu'à 48 heures à la température de la pièce ou jusqu'à 7 jours à une température de 2 à 8°C. |
| SD | 3. Tampon pour échantillon: solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine bovine et du sérum de souris. 0,1% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. |
| SB | 4. Tampon de substrat: Cette solution contient du diéthanolamine et du chlorure de magnésium. 0,02% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. Protéger de la lumière. |
| SS | 5. Solution d'arrêt: Hydroxide de sodium 3 M. Prêt à l'emploi. Employer avec précaution. |
| AH | 6. Conjugué: Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline (IgG/A/M) humaine, purifié par affinité et conjugué à la phosphatase alcaline. 0,1% d'azide de sodium. Diluer avec le tampon pour échantillon avant utilisation. |
| PN | 7. Substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate): Poudre cristalline. Reconstituer avec de l'eau déionisée ou distillée et diluer avec le tampon de substrat avant utilisation. Protéger de la lumière. |
| PC | 8. Sérum contrôle positif: sérum humain. 0,1% d'azide de sodium. Diluer avec le tampon pour échantillon avant utilisation. |

NC

9. Sérum contrôle négatif: sérum humain. 0,1% d'azide de sodium. Diluer avec le tampon pour échantillon avant utilisation.

PS

10. Scellants pour plaques.

PRÉCAUTIONS

- Ne pas utiliser de réactifs qui sont troubles ou contaminés.
- Prendre des précautions pour éviter la contamination du tampon pour échantillon et conjugué. Une contamination involontaire de ces réactifs avec du sérum humain ou du plasma entraînera la neutralisation du conjugué et ainsi l'échec du test.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- Les micropuits et les réactifs inclus dans ce coffret ne doivent pas être utilisés conjointement avec aucun autre ensemble de test.
- La substitution de composantes autres que celles fournies dans ce coffret peut entraîner des résultats incohérents ou erronés.
- Après chaque essai, disposer de toutes portions inutilisées de conjugué dilué, des contrôles positif et négatif dilués, et du réactif PNPP reconstitué et dilué.
- Lors de la préparation des dilutions, pipetter selon les instructions du fabricant afin d'assurer des techniques de distribution et de rinçage appropriées.
- La réaction entre l'enzyme et le substrat, se produisant lors de l'incubation finale, est sensible à la température et doit être exécutée dans un environnement contrôlé de 22-25°C.
- À cause de variations des instruments ou de températures constamment plus élevées ou plus faibles, il peut être nécessaire pour le laboratoire d'établir une période d'incubation légèrement plus longue ou plus courte afin d'obtenir de façon constante des résultats de contrôles valides. La température de l'incubation finale peut affecter les valeurs des contrôles, il est donc important de vérifier de façon périodique la température de la pièce d'incubation.

AVERTISSEMENTS

- Tous les sérums d'origine humaine utilisés dans les contrôles négatifs et positifs ont été testés et trouvés négatifs concernant les anticorps anti-VIH 1+2, l'hépatite C et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode ne peut offrir une totale assurance de l'absence de ces virus ou autres agents infectieux. Par conséquent, ces matériaux doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
- Certains réactifs fournis dans ce coffret contiennent l'azide de sodium comme agent de conservation.
MISE EN GARDE: L'azide de sodium réagit avec le plomb et le cuivre de la plomberie pour former des métaux azides hautement explosifs. Lorsque disposé dans l'évier, il est recommandé de rincer avec beaucoup d'eau pour éviter la concentration d'azide. L'azide de sodium est un poison, toxique si ingéré.
- La solution d'arrêt contient du NaOH un produit corrosif. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Tout renversement devrait être nettoyé immédiatement.
- Jeter les réactifs terminés selon les règlements locaux.

ÉCHANTILLONS

Le sang devrait être prélevé dans de l'ACD ou de l'EDTA (plasma) ou sans anticoagulant (sérum) selon des techniques aseptiques. Le sang devrait être testé pendant qu'il est encore frais afin de minimiser les risques d'obtenir de faux positifs ou de faux négatifs causés par un mauvais entreposage ou une contamination de l'échantillon. Les échantillons qui ne peuvent être testés immédiatement doivent être conservés à une température de 2-8°C jusqu'à 48 heures suivant le prélèvement, ou congelés. Les échantillons congelés à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ se conservent en bonne condition pour plusieurs années (2 à 3 ans). Cependant, pour éviter les effets néfastes de cycles répétés de congélation – décongélation, il est recommandé d'aliquoter les échantillons en petits volumes avant de les congeler. Éviter les congélateurs à dégivrage automatique.

Le sérum ou le plasma doit être séparé des cellules rouges lorsque conservé ou expédié.

Des particules ou des agrégats dans l'échantillon peuvent causer des résultats faux positifs ou de mauvaises valeurs de duplicata. Ces échantillons doivent être clarifiés par centrifugation avant d'être testés.

Seul le sérum humain entier ou le plasma est approprié pour cet essai. La dilution préalable des échantillons avec tout autre chose que le sérum humain normal, négatif pour ÉLISA, peut modifier les résultats.

Des échantillons contaminés par des microbes, hémolysés, lipémiques, ictériques ou inactivés par la chaleur peuvent donner des résultats incohérents et doivent être évités.

MODE OPÉRATOIRE

Matériel Fourni:

Les flacons peuvent contenir une quantité de réactif plus grande que celle indiquée sur l'étiquette. Bien mesurer le réactif avec un instrument approprié pour préparer les dilutions.

1. 3 – 2 x 8 barrettes de micropuits avec support
2. 1 x 50 ml solution de lavage concentrée
3. 1 x 14 ml tampon pour échantillon
4. 1 x 14 ml tampon de substrat
5. 1 x 14 ml solution d'arrêt
6. 1 x 80 µl conjugué anti-IgG/A/M humain
7. 3 x 50 mg substrat PNPP
8. 1 x 0,3 ml sérum contrôle positif
9. 1 x 0,7 ml sérum contrôle négatif
10. 6 scellants pour plaques

Matériel Nécessaire non Fourni:

1. Tubes à essai pour échantillons de patients, dilution des contrôles et dilution des réactifs.
2. Pipettes de transfert
3. Micropipettes ajustables pour distribuer 10 – 100 µl et 100 – 1000 µl avec des embouts jetables
4. Chronomètre
5. Lecteur de microplaque capable de mesurer des densités optiques de 405, 410 et 490 nm
6. Eau déionisée ou distillée
7. Papier absorbant
8. Instrument pour laver les microplaques
9. Centrifugeuse capable de séparer le serum ou le plasma des échantillons de patients
10. Incubateur ou bain-marie à 37°C

Procédure

1. Amener tous les réactifs à la température de la pièce.
2. Préparer une solution de lavage de travail en diluant la solution de lavage concentrée. Ajouter 1 volume de solution de lavage concentrée à 9 volumes d'eau déionisée ou distillée. Bien mélanger.
3. Déterminer le nombre d'échantillons de patients à tester. Utiliser le tableau de résultats pour assigner chaque échantillon à un emplacement consistant en une colonne. Noter l'identité de chaque échantillon sur le tableau de résultats.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET DES CONTRÔLES

4. Diluer comme suit et bien mélanger:

	Volume de tampon pour échantillon	Volume d'échantillon
PC	150 µl	50 µl
NC	300 µl	100 µl
Échantillon de patient	300 µl	100 µl

5. Retirer la monture de micropuits du sachet. Retirer rapidement et resceller toutes barrettes non utilisées dans le sachet protecteur.

NOTE: Une seule monture est fournie par coffret. Ne pas la jeter avant que toutes les barrettes aient été utilisées.

NOTE : Orienter la plaque afin que le puits A1 se situe dans le coin en haut à gauche. Soyez certain que toutes les barrettes soient mises de façon appropriées et insérées à la plaque. Etiqueter ou numéroter chaque barrette afin d'éviter des erreurs. Maintenir la même orientation de plaque durant tout l'essai.

6. Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail à chaque puits et laisser reposer 5 à 10 minutes à la température de la pièce.
7. Aspirer ou décanter énergiquement et inverser sur du tissu-éponge absorbant pour empêcher de s'assécher.

8. Ajouter 50 µl de la dilution appropriée du contrôle ou de l'échantillon aux puits désignés sur le tableau de résultats.

NOTE: Ne pas ajouter d'échantillons ou de réactifs aux puits vierges.

NOTE: Si plusieurs échantillons de patients différents sont testés en même temps, une seule série de contrôles est nécessaire. Étiqueter chaque barrettes pour éviter les erreurs.

9. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber de 30-35 minutes 37°C au bain-marie. Si un incubateur sec est utilisé au lieu du bain-marie, augmenter le temps d'incubation de 10 minutes.

10. Diluer le conjugué 1 dans 100 dans le tampon pour échantillon. Utiliser un contenant en polypropylène.

Barrettes:	1 – 2 x 8	3 – 2 x 8
AH	10 µl	30 µl
SD	1,0 ml	3,0 ml

NOTE: Le conjugué est une solution visqueuse. Amorcer les embouts de pipette en prélevant-distribuant 2-3 fois dans le conjugué avant de l'ajouter au tampon pour échantillon; rincer après chaque distribution. Bien mélanger.

11. ÉTAPES DE LAVAGE:

- Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur de tissu-éponge absorbant.
- Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
- Aspirer ou décanter.
- Répéter les étapes b et c pour un total de 3 à 4 lavages.
- Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle. Inverser sur du tissu-éponge absorbant pour empêcher de s'assécher.

NOTE: Il est important d'enlever complètement toute la solution de lavage après le dernier lavage.

12. Ajouter 50 µl de conjugué dilué (préparé précédemment) à chaque puits SAUF aux puits désignés VIERGES.

13. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber de 30-35 minutes à 37°C au bain-marie. Si un incubateur sec est utilisé au lieu du bain-marie, augmenter le temps d'incubation de 10 minutes.

14. Dissoudre le substrat PNPP en ajoutant 0,5 ml d'eau déionisée ou distillée à la fiole. Remettre le bouchon et bien mélanger. Protéger de la lumière jusqu'à utilisation.

15. Diluer le PNPP 1 dans 100 dans le tampon de substrat.

Barrettes:	1 – 2 x 8	3 – 2 x 8
PN	20 µl	60 µl
SB	2,0 ml	6,0 ml

Bien mélanger. Protéger de la lumière jusqu'à utilisation.

16. ÉTAPES DE LAVAGE:

- Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur de tissu-éponge absorbant.
- Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
- Aspirer ou décanter.
- Répéter les étapes b et c pour un total de 3 à 4 lavages.
- Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle. Inverser sur du tissu-éponge absorbant pour empêcher de s'assécher.

Poursuivre rapidement les trois prochaines étapes.

17. Ajouter 100 µl de la solution de PNPP diluée à chaque puits SAUF ceux désignés VIERGES.

18. Incuber les micropuits dans l'obscurité pendant 30 minutes à la TEMPÉRATURE DE LA PIECE (22-25°C).

NOTE: Le temps et la température d'incubation suite à l'ajout du PNPP sont critiques.
NE PAS varier le temps et la température d'incubation établis. À des fins d'uniformité, débiter le chronométrage rapidement après l'ajout du réactif au premier puits.

19. Arrêter la réaction par l'ajout de 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits dans le même ordre que celui utilisé lors de l'ajout du substrat. Ajouter 200 µl de la solution d'arrêt aux puits vierges.
20. Lire la densité optique de chaque puits à 405 ou 410 nm en utilisant un filtre de référence de 490 nm. Si les résultats ne peuvent être lus immédiatement, laisser les puits dans l'obscurité jusqu'à 30 minutes.
21. Soustraire la valeur obtenue pour les puits vierges de tous les puits contenant les contrôles et les échantillons. Plusieurs instruments de lecture ÉLISA sont programmés pour faire ce calcul automatiquement.
22. Noter les résultats obtenus sur le tableau de résultats.

CONTROLE QUALITÉ

Le contrôle de qualité de PAK[®]1 est bâti à l'intérieur de cet ensemble de test par l'inclusion de sérums contrôles positifs et négatifs. Ces contrôles doivent être inclus lors de chaque essai pour aider à déterminer si des erreurs techniques ou des échecs de réactifs se sont produits.

Critères pour valider le test:

	Contrôle Négatif	Contrôle Positif
Valeur moyenne de la densité optique (OD)	$\leq 0,175$	$\geq 1,000$

Les valeurs de densité optique obtenues pour les duplicata doivent être à l'intérieur de 20% de la moyenne des deux valeurs. Les échantillons pour lesquels les résultats sont à l'extérieur de cette limite doivent être retestés.

NOTE: De mauvaises valeurs de duplicata peuvent être causées par l'omission d'un réactif ou de l'échantillon, l'ajout inégal des réactifs, une température d'incubation inégale, une exposition à la lumière lors de l'incubation finale, ou une contamination entre puits. L'absence de résultats de tests en duplicata peut mener à l'approbation de résultats erronés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de tests démontrant des valeurs de densité optique égales ou plus grandes que 2X la valeur obtenue pour la moyenne des contrôles négatifs des glycoprotéines correspondantes (2 valeurs de contrôle négatif pour chaque glycoprotéine) sont considérés comme résultats positifs.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Des résultats erronés peuvent être causés par une contamination bactérienne des matériaux du test, des périodes d'incubation inadéquates, un mauvais lavage ou décantage des puits, une exposition du substrat à la lumière, l'omission de réactifs, une exposition à des températures plus élevées ou plus faibles que celles prescrites, ou l'omission d'étapes.

La présence de complexes immuns ou autres agrégats d'immunoglobulines dans les échantillons de patients peut causer une augmentation de la liaison non-spécifique et produire de faux positifs dans cet essai.

Les résultats d'un test qui ne sont pas conformes à une spécificité d'allo-anticorps sont considérés comme étant indéterminés. Ces échantillons doivent être à nouveau prélevés ou/et re-testés, ou testés par une autre méthode comme le GTI MACE[®] ou MAIPA.

Les résultats de cet essai ne doivent pas être utilisés comme le seul fondement d'un jugement clinique.

Certains anticorps à faible titre et faible avidité peuvent ne pas être détectés dans cet essai.

Les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de plaquettes qui ne sont pas représentés dans le tableau de résultats peuvent ne pas être détectés.

La présence d'autres antigènes spécifiques de plaquettes situés sur GPIIb/IIIa, tels que HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) et HPA-8b (Sr^a), n'a pas été déterminée pour les plaquettes isolées dans les puits GPIIb/IIIa. Il est possible que des allo-anticorps dirigés contre ces systèmes soient réactifs dans ce test.

Ce produit ne détecte pas les anticorps d'antigènes HLA de classe I.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Lorsque bien entreposé et utilisé selon le mode opératoire décrit ci-dessus, ce produit peut détecter des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de plaquettes identifiés sur le tableau de résultats inclus.

Afin d'assurer une réactivité et une spécificité adéquates, chaque lot de PAK[®]1 est testé avant la mise en vente avec des échantillons connus pour posséder les glycoprotéines identifiées sur le tableau de résultats inclus ainsi que des échantillons connus ne possédant ces anticorps.

Évaluation de la Performance

		Méthode Comparative		Total
		Positif	Négatif	
PAK [®] 1	Positif	13	1	14
	Négatif	1	195	196
Total		14	196	210

Concordance: 99%

Co-positivité: 92,9% Co-négativité: 99,5%

Méthode Comparative Test d'Hémagglutination Passive Inversée

RÉFÉRENCES

1. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen Pl(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.[™]

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

PAK[®]1

- POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*
- CONSERVER À UNE TEMPÉRATURE DE 2-8°C



REF PAK1

Révision: 2007-07-10 (F)



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

www.gtidiagnostics.com