

PAK[®]1

USO

PAK[®]1 é un (ELISA) in fase solida preparato per determinare anticorpi piastrino-specifici reattivi con gli epitopi delle glicoproteina IIb/IIIa.

Per uso diagnostico in vitro.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

L'esistenza di antigeni piastrino specifici sulle glicoproteine piastriniche é stata ampiamente descritta da vari ricercatori.^{1,2,3,4,5} Anticorpi piastrino-specifici presenti in seguito a gravidanza o trasfusione può provocare l'immuno distruzione delle piastrine trasfuse.^{6,7,8} Confermare la presenza di questi anticorpi nel siero dei pazienti può essere di aiuto nella ricerca del donatore compatibile.

Il kit in fase solida PAK[®]1 fornisce le glicoproteine piastriniche IIb/IIIa legate a microstrip mediante anticorpo monoclonale ottenute da donatori di gruppo 0 con fenotipo piastrinico noto. Il test é preparato per la determinazione di anticorpi diretti verso specifici epitopi della glicoproteina IIb/IIIa. La configurazione dei pozzetti é descritta sulla Recording Sheet.

PRINCIPIO

Il siero paziente o plasma é aggiunto a microstrip rivestite con glicoproteine piastriniche per permette agli anticorpi di legarsi, se presenti. Anticorpi non legati vengono lavati. Si dispensa l'antiglobulina umana coniugata con fosfatasi alcalina (Anti-IgG/A/M) ad ogni pozzetto e si incuba. Il coniugato Anti-IgG/A/M non legato viene lavato, si dispensa, infine, il substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato) dopo una incubazione di 30 minuti, si stoppa la reazione con la soluzione NaOH. La densità ottica della colorazione sviluppata è misurata fotometricamente.

REAGENTI

Numero massimo di test per kit: 5

Tutti i reagenti devono essere conservati come indicato sull'etichetta.

- | | |
|------------|---|
| MS | 1. Microstrip: microstrip a fondo piatto a cui sono state immobilizzate glicoproteine piastriniche IIb/IIIa. I microstrip sono chiusi in busta risigillabile. Pronto all'uso. |
| TCW | 2. Soluzione di lavaggio concentrata (10x): Tampone Tris (idrossimetil) aminometano contenente sodio cloride e Tween 20. 1% sodio azide. Diluire con acqua deionizzata o distillata prima dell'uso. Conservare la soluzione di lavaggio a temperatura ambiente fino a 48 ore o fino a 7 giorni a 2 – 8°C. |
| SD | 3. Diluente campione: Soluzione tampone fosfato contenente albumina bovina e siero di topo. 0.1% sodio azide. Pronto all'uso. |
| SB | 4. Tampone Substrato: questa soluzione contiene dietanolamina e magnesio cloride. 0.02% sodio azide. Pronto all'uso. Proteggere dalla luce. |
| SS | 5. Soluzione stoppante: 3 M NaOH. Pronto all'uso. Usare con cautela. |
| AH | 6. Coniugato: anti globulina umana di capra coniugata con Fosfatasi alcalina (IgG/A/M). Contiene 0.1% sodio azide. Diluire con diluente campione prima dell'uso. |
| PN | 7. Substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato): in polvere. Sciogliere con acqua deionizzata o distillata e diluire nel tampone enzimatico prima dell'uso. Proteggere dalla luce. |
| PC | 8. Siero controllo Positivo: siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente campione prima dell'uso. |
| NC | 9. Siero controllo Negativo: siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente campione prima dell'uso. |

AVVERTENZE

- Non usare i reagenti torbidi o contaminati.
- Usare con cautela per evitare la contaminazione del Diluente campione e del Coniugato. L'eventuale contaminazione di questi reagenti con siero umano o plasma neutralizza il Coniugato e porta al fallimento del test.
- Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Strip e reagenti contenuti nel kit non devono essere usati in unione con altri kit.
- La sostituzione dei componenti del kit con altri può portare a risultati del test sbagliati.
- Gettare porzioni non utilizzate di Coniugato, dei controlli diluiti, e di PNPP sciolto o diluito alla fine di ogni test.
- Per preparare le diluizioni, seguire le istruzioni del produttore per la scelta delle pipette appropriate.
- L'incubazione finale con il substrato enzimatico é sensibile alla temperatura, dovrebbe essere eseguita in un'area a 22 – 25°C.
- A causa delle variazioni nella strumentazione o nella temperatura ambientale, può essere necessario per il laboratorio stabilire un tempo di incubazione più lungo o più breve in modo da ottenere risultati corretti. L'incubazione finale può avere effetti sui valori di controllo, é quindi importante monitorare periodicamente il valore della temperatura ambientale.

PRECAUZIONI

- Il siero umano usato per i controlli Positivo e Negativo è stato testato e riscontrato negativo per anticorpi anti HIV, HCV e HBsAg con metodi FDA approvati. Nessun metodo può, comunque, offrire una assoluta sicurezza dell'assenza di virus HIV, epatite C e epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tali materiali dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti forniti con i kit contengono sodio azide come conservante.
ATTENZIONE: Sodio azide reagisce con piombo e rame formando metalli di azidi esplosivi. Quando gettato nel lavandino sciacquare con molta acqua. Sodio azide é velenoso e tossico se ingerito.
- La Soluzione Stoppante (NaOH) é corrosiva. Evitare il contatto con pelle ed occhi. Gli schizzi devono essere puliti immediatamente.
- Quando i componenti del kit sono finiti gettarli seguendo le regole locali.

RACCOLTA CAMPIONI

Il sangue dovrebbe essere raccolto in ACD o EDTA (plasma) o senza anticoagulante (siero) usando tecniche asettiche e dovrebbe essere testato fresco per minimizzare il rischio di possibili reazioni falsamente positive o negative causate da conservazioni improprie o contaminazione dei campioni. I campioni che non possono essere testati immediatamente possono essere conservati a 2 – 8°C per 48 ore o congelati. Campioni congelati a –20°C o oltre rimangono in buone condizioni per anni (2-3 anni). Comunque per evitare gli effetti del deterioramento per effetto di congelamenti e scongelamenti ripetuti, si raccomanda di aliquotare i campioni prima del congelamento.

Il siero o plasma deve essere separato dalle cellule quando conservato o trasportato.

La presenza nel campione di particelle o aggregati può causare risultati falso positivi o scarsamente ripetibili. Centrifugare i campioni contenenti particelle prima del test.

Per questo test usare solo siero umano intero o plasma. La diluizione dei campioni con diluenti diversi da quello fornito può inficiare i risultati.

Campioni battericamente contaminati, emolizzati, lipemici, itterici, o inattivati al calore possono portare a risultati errati.

PROCEDURA

Materiali Forniti:

I flaconi possono contenere più reagente di quanto descritto sull'etichetta. Quando si preparano le diluizioni misurare i reagenti con pipette appropriate.

1. 3 – 2 x 8 Microstrips con supporto
2. 1 x 50 mL Soluzione Concentrata
3. 1 x 14 mL Diluente Campioni
4. 1 x 14 mL Tampone Substrato

5. 1 x 14 mL Soluzione Stoppante
6. 1 x 80 µL Coniugato Umano Anti-IgG/A/M
7. 3 x 50 mg Substrato PNPP
8. 1 x 0.3 mL Siero Controllo Positivo
9. 1 x 0.7 mL Siero Controllo Negativo
10. 6 Copripiastre

Ulteriori Materiali Richiesti:

1. Provette per campioni, controlli e diluizioni
2. Pipette
3. Micropipette graduate per dispensare 10 – 100 µL e 100 – 1,000 µL e pipette
4. Sveglia
5. Lettore per micropiastre per la lettura delle DO a 405 o 410 e 490 nm
6. Acqua deionizzata o distillata
7. Carta assorbente
8. Lavatore per micropiastre
9. Centrifuga per la separazione del siero o plasma pazienti
10. 37°C bagno-maria o incubatore

Metodica

1. Portare i reagenti a temperatura ambiente.
2. Preparare la soluzione di lavaggio. Diluire 1 volume di soluzione concentrata in 9 volumi di acqua deionizzata o distillata.
Miscelare bene.
3. Calcolare il numero di pazienti da testare. Usando la Recording Sheet assegnare la posizione di ogni campione testati in doppio. Registrare l'identificativo di ogni campione sulla Recording Sheet.

PREPARARE CAMPIONI E CONTROLLI

4. Diluire come segue e miscelare bene:

	Volume Diluente Campione	Volume Campione
PC	150 µL	50 µL
NC	300 µL	100 µL
Campione Paziente	300 µL	100 µL

5. Rimuovere gli strip necessari dalla busta. Rimuovere velocemente e risigillare nella busta gli strip inutilizzati.

NOTA: Con ogni kit viene fornito un solo supporto. Non gettarlo fino alla fine dell'utilizzo degli strip.

NOTA: Orientare il supporto in modo tale che il pozzetto A1 sia posizionato in alto in corrispondenza dell'angolo sinistro. Assicurarsi che tutti gli strip siano correttamente inseriti nel supporto. Etichettare o numerare ogni strip per evitare errori. Mantenere il supporto nello stesso orientamento durante l'esecuzione del test.

6. Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio ai pozzetti e lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti.

7. Aspirare o decantare e asciugare bene gli strip invertendo su carta assorbente.

8. Dispensare 50 µL dei controlli o dei campioni nei pozzetti corrispondenti sulla Recording Sheet.

NOTA: Non dispensare controllo o campioni nei pozzetti del bianco.

NOTA: Se si testano più campioni in una sola seduta preparare un solo set di controlli. **IDENTIFICARE GLI STRIP PER EVITARE ERRORI.**

9. Coprire la piastra ed incubare per 30-35 minuti 37°C in bagno-maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.

10. Diluire il Coniugato 1 a 100 con il diluente campioni. Usare un contenitore di polipropilene.

Strip:	1 – 2 x 8	3 – 2 x 8
AH	10 µL	30 µL
SD	1.0 mL	3.0 mL

NOTA: Il coniugato é viscoso. Aspirare 2-3 volte con la pipetta prima di dispensare e sciacquare bene il puntale nel diluente. Miscelare bene.

11. LAVAGGIO:

- Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio.
- Aspirare o decantare.
- Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

NOTA: É importante rimuovere ogni residuo di soluzione dopo il lavaggio finale.

11. Dispensare 50 µL di coniugato diluito (come preparato al punto 10) in tutti i pozzetti tranne quelli destinati al BIANCO.

13. Coprire gli strip ed incubare per 30-35 minuti a 37°C in bagno maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.

14. Sciogliere il PNPP in polvere aggiungendo nel flacone 0.5 mL di acqua deionizzata o distillata. Chiudere e miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.

15. Diluire il PNPP sciolto 1 a 100 in tampone Substrato.

Strip:	1 – 2 x 8	3 – 2 x 8
PN	20 µL	60 µL
SB	2.0 mL	6.0 mL

Miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.

16. LAVAGGIO:

- Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio.
- Aspirare o decantare.
- Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

Passare velocemente agli step successivi.

17. Dispensare 100 µL PNPP diluito a tutti i pozzetti ad eccezione dei pozzetti destinati al BIANCO.

18. Incubare gli strip per 30 minuti a TEMPERATURA AMBIENTE (22 – 25°C) al buio.

NOTA: Tempi e temperatura di questa incubazione sono critici. NON variare i tempi e le temperature stabilite. Fare partire il tempo di incubazione al momento della dispensazione del PNPP al primo pozzetto.

19. Stappare la reazione dispensando 100 µL di soluzione stoppante ad ogni pozzetto nella stessa sequenza in cui si é aggiunto il substrato. Dispensare 200 µL di soluzione stoppante ai pozzetti del bianco.

20. Leggere le assorbanze (DO) di ogni pozzetto a 405 o 410 nm usando un filtro di riferimento a 490 nm. Se i risultati non possono essere letti immediatamente, riportare gli strip al buio per 30 minuti al massimo.

21. Sottrarre i valori del bianco ad ogni valore dei campioni e dei controlli. Molti lettori ELISA sono programmati per sottrarli automaticamente.

22. Registrare i risultati sulla Recording Sheet.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il controllo di qualità PAK[®]1 é incluso in ogni kit grazie alla presenza dei sieri di controllo negativo e positivo. Questi controlli dovrebbero essere inclusi in ogni esecuzione del test per aiutare a determinare la presenza di errori tecnici o non reattività dei reagenti.

Criteri di validazione dei test:

	Controllo Negativo	Controllo Positivo
Media DO	≤ 0.175	≥ 1.000

I valori di DO ottenuti in campioni in doppio possono variare al massimo del 20%. Campioni al di fuori di questi limiti dovrebbero essere ritestati.

NOTA: La non riproducibilità può essere causata da omissione dei reagenti o dei campioni, aggiunta inadeguata dei reagenti, temperatura di incubazione inadeguata, esposizione alla luce durante l'incubazione finale o cross contaminazione dei pozzetti. La non riproducibilità influenza l'accettazione dei risultati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati con valori di DO uguali o superiori al valore ottenuto dalla media dei controlli negativi per ogni singola glicoproteina X2 (2 controlli negativi per ogni glicoproteina) sono considerati positivi.

LIMITAZIONI

Risultati errati possono avvenire per contaminazione batterica dei componenti del kit, incubazione inadeguata, lavaggi inadeguati, esposizione alla luce del substrato, omissione dei reagenti, esposizione a temperature più elevate o inferiori a quelle indicate, o omissione di step di lavoro.

La presenza di immunocomplessi o aggregati immunoglobulinici nel paziente può causare un aumento di legami non specifici e produrre risultati falsamente positivi.

I risultati che non incontrano un pattern di specificità per allo-anticorpi sono considerati indeterminati. Questi campioni devono essere riprelevati e/o ritestati con un altro metodo come, ad esempio, GTI MACE[®] o MAIPA.

I risultati di questo test non dovrebbero essere usati come unica base per una decisione clinica.

Alcuni anticorpi a basso titolo o bassa avidità potrebbero non essere determinati da questo test.

Anticorpi verso antigeni piastrinici non rappresentati sul foglio di lavoro non sono determinati.

La presenza di altri anticorpi piastrino specifici verso altri antigeni posti sulla GpIIb/IIIa come HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) e HPA-8b (Sr^a) non sono determinate dagli antigeni presenti nel pozzetto della GPIIb/IIIa. E' possibile che anticorpi verso questi sistemi possano reagire con questo test.

Questo prodotto non determina anticorpi anti-HLA di classe I.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST

Quando appropriatamente conservati ed usati secondo la procedura descritta, questo prodotto può determinare anticorpi piastrino-specifici come identificati sul foglio di lavoro incluso.

Per garantire reattività e specificità ogni lotto di PAK[®]1 é testato prima della commercializzazione con campioni contenenti anticorpi reattivi con le glicoproteine indicate sul foglio di lavoro così come campioni privi di anticorpi.

Valutazione del Test

Metodo di Confronto

PAK [®] 1		Metodo di Confronto		Totale
		Positivo	Negativo	
	Positivo	13	1	14
	Negativo	1	195	196
	Totale	14	196	210

Concordanza: 99%

Co-positività: 92.9% Co-negatività: 99.5%

Metodo di Confronto: RPHA = Test di Emoagglutinazione Passiva Inversa

REFERENZE

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.[™]

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

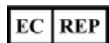
PAK[®]1

- PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*
- CONSERVARE A 2 – 8°C



REF PAK1

Rev. 2007-07-10 (I)



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

www.gtidiagnostics.com