

AVSEDD ANVÄNDNING

B-SCREEN® är en kvalitativ enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) i fast fas, vilken är utformad för att detektera antikroppar IgG mot HLA klass II-antigener.

För *in vitro*-diagnostik.

KORTFATTAD FÖRKLARING

HLA är ett viktigt antigensystem vid bestämning av överlevnad av transplanterade allograft eller transfunderande trombocyter hos sensibiliserade individer.¹ HLA-antikroppar kan erhållas genom alloimmunisering till följd av graviditet, transfusion av blodprodukter eller tidigare transplantat. I allmänhet leder alloimmunisering till bildning av HLA-antikroppar hos ungefär 33 % av de exponerade individerna.²

B-SCREEN® ELISA i fast fas tillhandahåller affinitetsrenade glykoproteiner av HLA klass II, vilka erhållits från EBV-transformerade B-lymfocytcellinjer. Lymfocyterna är noggrant utvalda för att tillhandahålla en stor mängd HLA klass II-antigener.

METODPRINCIP

Patientens serum eller plasma tillsätts i mikrobrunnar som är belagda med affinitetsrenad HLA klass II glykoproteiner, vilket gör det möjligt för antikroppar att binda om sådana förekommer. Obundna antikroppar tvättas därefter bort. Ett alkaliskt fosfatasmärkt anti-humanant globulinreagens (anti-IgG) tillsätts i brunnarna och inkuberas. Obundet anti-IgG 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: 44

Alla reagenser ska förvaras enligt anvisningar på etiketten.

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Mikrobrunnar: Flatbottnade mikrobrunnarsremor på vilka affinitetsrenad HLA klass II glykoproteiner har immobiliserats. Mikrobrunnarna ligger i en återförslutningsbar foliepåse. Klara att använda. |
| TCW | 2. Koncentrerad tvättlösning (10 x): Tris-(hydroxymetyl)-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. |
| AG | 6. Konjugat: Alkaliskt fosfataskonjugerad affinitetsrenad getantikropp mot humana immunglobuliner G (IgG). 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. |

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 utan antikoagulantia 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-/upptiningscykler, rekommenderas dock att prover delas upp i små volymer och därefter förvaras frysta. Undvik frostfria frysar.

Serum 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 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 serum 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. 12 – 1 x 8 mikrobrunnaremsor 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-konjugat
7. 6 x 50 mg PNPP-substrat
8. 1 x 0,45 mL positiv serumkontroll
9. 1 x 0,7 mL negativ serumkontroll
10. 12 Plattförseglare

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 engångspetsar
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.
(Använd baksidan om endast ett prov testas.)

BEREDA PROVER OCH KONTROLLER

4. Späd enligt följande och blanda väl:

	Volym av provspädningsmedel	Volym av prov
PC	75 µL	75 µL
NC	75µL	75 µL
flera prover	110 µL	110 µL
Patientprov	100 µL	100 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:	2-1x8	12-1x8
AG	10 µL	60 µL
SD	1,0 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.

10. 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.
- Dekanter 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:	2-1x8	12-1x8
PN	20 µL	120 µL
SB	2,0 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.
- Dekanter 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 B-SCREEN® 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	Positiv kontroll
Genomsnittlig OD	0,070 – 0,250	≥ 1,500

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 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.

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.

Lymfocytotoxiska icke-HLA-antikroppar detekteras inte med denna analys.

Denna produkt detekterar inte IgM-, IgA- eller HLA klass I-antikroppar.

De affinitetsrenade HLA klass II-glykoproteiner som används vid tillverkningen av denna produkt kommer från EBV-transformerade B-lymfocyter som representerar följande HLA klass II-antigener: DR1, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DR103, DR51, DR52 och DR53.

Monospecifika antikroppar mot sällsynta alleler som inte är representerade i denna pool kan inte detekteras i denna analys.

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 IgG mot HLA klass II-antigener.

För att säkerställa lämplig reaktivitet och specificitet, testas varje parti av B-SCREEN® innan det släpps ut med prover som man vet innehåller alloantikroppar som reagerar med HLA klass II-antigener, liksom prover som man vet saknar sådana antikroppar.

Utvärdering av prestanda

Jämförande metod

		Positiva	Negativa	Totalt
B-SCREEN®	Positiva	70	3	73
	Negativa	2	132	134
	Totalt	72	135	207

Överensstämmelse: 97,6%

Sampositivitet: 97,2% Samnegativitet: 97,8%

Jämförande metod: Pärlbaserad flödescytometri

REFERENSER

1. Marsh SGE, Parham P, Barber LD, The HLA Facts Book. Academic Press 2000: 84-91.
2. Rodey Glenn E. HLA Beyond Tears. De Novo, Inc. 2000;213.



GTi DIAGNOSTICS®

Good science starts with people.®

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

REF BCSG

Rev. 2007-06-27 (Sw)



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

www.gtidiagnostics.com

B-SCREEN®

FÖR *IN VITRO* DIAGNOSTISK ANVÄNDNING

FÖRVARAS VID 2–8 °C

