

Quik-ID® Class II

UTILISATIONS PRÉVUES

Quik-ID® Class II est un essai qualitatif par la méthode ÉLISA (enzyme linked immunosorbent assay) en phase solide conçu pour détecter les panels d'anticorps IgG réactifs (PRA) contre des antigènes HLA de classe II.

Pour usage diagnostique in vitro.

SOMMAIRE ET EXPLICATION

Le système HLA est un système antigénique jouant un rôle majeur dans la détermination de la survie de la transplantation des allogreffes ou de la transfusion de plaquettes chez les individus sensibilisés.¹ Les anticorps HLA peuvent être acquis par l'allo-immunisation résultant d'une grossesse, d'une transfusion de produits sanguins ou de transplantations antérieures. En général, l'allo-immunisation conduit à la production d'anticorps HLA chez approximativement 33% des individus exposés.²

Le test ÉLISA en phase solide Quik-ID® Class II fournit des glycoprotéines HLA de classe II provenant de lignées cellulaires de lymphocytes B transformées par le virus Epstein-Barr, chacune immobilisée dans des micropuits différents grâce à un anticorps monoclonal. Le type de molécule HLA de classe II de chaque donneur et le nombre de puits contenant chaque antigène se trouve sur le tableau de résultats.

Le test ÉLISA en phase solide Quik-ID® Class II est conçu pour être utilisé comme accompagnement au produit B-SCREEN®. Les échantillons préalablement identifiés de façon positive dans l'essai de dépistage peuvent être testés davantage avec Quik-ID® Class II afin de déterminer la valeur du panel d'anticorps réactifs (Panel Reactive Antibody, PRA) et/ou la spécificité.

PRINCIPE

Le sérum est ajouté aux micropuits enrobés avec glycoprotéines HLA de classe II 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) est ajouté aux puits et incubé. Les Anti-IgG 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: 10

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

MS 1. Micropuits: barrettes avec micropuits à fond plat auxquels des molécules HLA de classe II ont été attachées. Les barrettes de micropuits, codées par couleurs, sont incluses dans des sachets d'aluminium refermables. 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. 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.

AG 6. Conjugué: Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G (IgG) 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 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

Il est recommandé de prélever le sang sans anticoagulant 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'aliqoter les échantillons en petits volumes avant de les congeler. Éviter les congélateurs à dégivrage automatique.

Le sérum 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 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, icteriques ou inactivés par la chaleur peuvent donner des résultats incohérents et devraient 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. 5 montures de micropuits, chacun contenant 10 – 1 x 8 barrettes codées par couleurs et une carte-clé des couleurs
2. 1 x 125 ml solution de lavage concentrée
3. 1 x 50 ml tampon pour échantillon
4. 1 x 60 ml tampon de substrat
5. 1 x 50 ml solution d'arrêt
6. 1 x 350 µl conjugué anti-IgG humain
7. 5 x 50 mg substrat PNPP
8. 1 x 0,45 ml sérum contrôle positif
9. 1 x 0,7 ml sérum contrôle négatif
10. 10 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 sérum 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.

De Réactifs	1 plaque (2 échantillons)	2 plaques (4 échantillons)	3 plaques (6 échantillons)	4 plaques (8 échantillons)	5 plaques (10 échantillons)
TCW	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml	125 ml
L'eau déionisée ou distillée	225 ml	450 ml	675 ml	900 ml	1125 ml

3. Déterminer le nombre d'échantillons de patients à tester.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET DES CONTRÔLES

4. Diluer comme suit et bien mélanger:

Échantillon de patient	425 µl
SD	1,275 ml

De Réactifs	1 plaque (2 échantillons)	2 plaques (4 échantillons)	3 plaques (6 échantillons)	4 plaques (8 échantillons)	5 plaques (10 échantillons)
NC	120 µl	250 µl	350 µl	450 µl	550 µl
SD	360 µl	750 µl	1050 µl	1,35 ml	1,65 ml
PC	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
SD	180 µl	360 µl	540 µl	720 µl	900 µl

5. Chaque échantillon requiert une série de barrettes codées par couleurs. Retirer rapidement et resceller toutes barrettes non utilisées dans le sachet protecteur.

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 numéroté chaque barrette afin d'éviter des erreurs. Maintenir la même orientation de plaque durant tout l'essai.

S'assurer que l'extrémité ronde de chaque barrette est du côté inférieur de la plaque. Avant l'addition de chaque réactif, s'assurer que le puits A1 se trouve dans le coin en haut à gauche de la plaque.

NOTE: Assurez-vous que l'ordre des barrettes dans la monture correspond à l'ordre sur la carte-clé des couleurs.

6. Ajouter 250 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 du contrôle approprié ou de l'échantillon dans les puits tel qu'indiqué à la figure 1. Ajouter le sérum de patient à tous les puits numérotés ainsi qu'aux puits NA et MO.

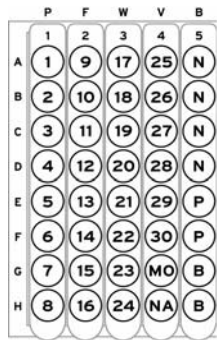


Figure 1

N = Contrôle Négatif
P = Contrôle Positif
B = Blanc (puits vierges)
NA = Pas d'Antigène
MO = Monoclonal Seulement

Lettres pour les Couleurs:

P = Rose
F = Fuschia
W = Blanc
V = Violet
B = Noir

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

NOTE: Si plusieurs échantillons de patients différents sont testés en même temps, étiqueter chaque barrette 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.

De Réactifs	1 plaque (2 échantillons)	2 plaques (4 échantillons)	3 plaques (6 échantillons)	4 plaques (8 échantillons)	5 plaques (10 échantillons)
AG	45 µl	90 µl	135 µl	180 µl	225 µl
SD	4,5 ml	9 ml	13,5 ml	18 ml	22,5 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. ÉTAPE DE LAVAGE:

- Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur de tissu-éponge absorbant.
- Ajouter 250 µl de solution de lavage de travail.

- c) Aspirer ou décanter.
- d) Répéter les étapes b et c pour un total de 3 à 4 lavages.
- e) 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.

De Réactifs	1 plaque (2 échantillons)	2 plaques (4 échantillons)	3 plaques (6 échantillons)	4 plaques (8 échantillons)	5 plaques (10 échantillons)
PN	90 µl	180 µl	270 µl	360 µl	450 µl
SB	9 ml	18 ml	27 ml	36 ml	45 ml

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

16. ÉTAPE DE LAVAGE:

- a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur de tissu-éponge absorbant.
- b) Ajouter 250 µl de solution de lavage de travail.
- c) Aspirer ou décanter.
- d) Répéter les étapes b et c pour un total de 3 à 4 lavages.
- e) 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 Quik-ID® Class II 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)	≤ 0,225	≥ 1,000

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Calculer la limite d'inclusion pour chaque puits comme suit:

Moyenne des puits Contrôles Négatifs
(A, B, C, et D de la bande Noir) X 2 X Bruit de fond
Facteur d'Ajustement = Limite d'Inclusion pour le puits
(voir le Tableau de Résultats)

Les résultats de tests ayant des valeurs de densité optique égales ou plus grandes que la limite d'inclusion sont considérés comme des résultats positifs.

Calculer le pourcentage du panel d'anticorps réactifs (PRA) comme suit:

$$\% \text{ PRA} = \frac{\# \text{ de Résultats Positifs}}{\# \text{ de puits contenant la molécule HLA classe II}} \times 100$$

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 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.

Le puits sans antigène (puits H de la bande violette) ne contient pas d'anticorps monoclonal ou de glycoprotéines HLA et est utilisé pour détecter la liaison non-spécifique.

Le puits 'monoclonal seulement' (puits G de la bande violette) contient seulement un anticorps monoclonal de souris. La réactivité de ce puits peut être causée par une réactivité avec les anticorps de capture de ce test, la présence d'anticorps contre les IgG de souris ou de complexes immuns.

Les échantillons de patients qui donnent des valeurs plus élevées dans le puits sans antigène et/ou dans le puits 'monoclonal seulement' que la valeur limite d'inclusion du contrôle négatif doivent être retestés par une autre méthode.

Des anticorps lymphocytotoxiques non-HLA ne seront pas détectés par ce test.

Ce produit ne détecte pas les anticorps IgM, IgA, ou les anticorps contre les molécules HLA de classe I.

Certains anticorps anti-HLA non cytotoxiques peuvent être détectés par cette technique alors qu'ils ne réagissent pas dans le test de lymphocytotoxicité

Ce produit détecte les anticorps dirigés contre des antigènes HLA représentés dans ce panel. (Voir le tableau de résultats de lot spécifique). Les anticorps dirigés contre des antigènes non représentés peuvent ne pas être détectés.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Lorsque bien entreposé et utilisé selon le mode opératoire décrit ci-dessus, ce produit peut détecter les anticorps IgG contre les molécules HLA de classe II identifiés sur le tableau de résultats inclus.

Afin d'assurer une réactivité et une spécificité adéquates, chaque lot de Quik-ID® Class II est testé avant la mise en vente avec des échantillons connus pour posséder des allo-anticorps réagissant avec les molécules HLA de classe II ainsi que des échantillons connus ne possédant pas ces anticorps.

Évaluation de la Performance

		Méthode Comparative		Total
		Positif	Négatif	
Quik-ID® Class II	Positif	45	3	48
	Négatif	3	36	39
Total		48	39	87

Concordance: 93,1%

Co-positivité: 93,7% Co-négativité: 92,3%

Méthode Comparative Cytométrie en Flux à Base de Billes

RÉFÉRENCES

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.

U.S. Patent #6,046,013



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

REF C2ID

Révision: 2007-08-07 (F)



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

www.gtidiagnostics.com



Quik-ID® Class II

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