

Quik-ID® Class II

Gebrauchsanleitung

Quik-ID® Class II ist ein qualitativer Festphasenenzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von Panel-Reaktiven IgG-Antikörpern (PRA) gegen HLA Klasse II Antigene.

Zum in-vitro Gebrauch.

Zusammenfassung und Erläuterungen

HLA ist ein "major antigenic" System zur Bestimmung/Bewertung der Überlebenschancen nach Transplantationen oder Thrombozytentransfusionen bei sensibilisierten Individuen.¹ HLA Antikörper werden durch aktive Immunisierung während einer Schwangerschaft, durch Transfusion von Blutprodukten oder durch vorausgegangene Organtransplantationen erworben. Eine Alloimmunisation führt in ca. 33% aller exponierten Fälle zur Antikörperbildung.²

Die Festphase des Quik-ID® Class II Enzymimmunoassay wird mit hochgereinigten HLA Klasse II Glykoproteinen, die von EBV transformierten B-Lymphozyten Zelllinien isoliert wurden und mittels eines monoklonalen Antikörpers an die Vertiefungen/Mikrowells gebunden werden, beschichtet. Den HLA Klasse II Typ der einzelnen Zelllinien und die Frequenz der Antigene können Sie dem beiliegenden Protokollbogen/Recording Sheet entnehmen.

Der Quik-ID® Class II ELISA ist als Ergänzung zum B-SCREEN® zu sehen. Positive Proben im Screening sollten im Quik-ID® Class II auf ihre Panel-Reaktivität (PRA) und/oder auf ihre Spezifitäten untersucht werden.

Testprinzip

Patientenserum wird in die Vertiefungen/Mikrowells, die mit HLA Klasse II Glykoproteinen beschichtet sind, pipettiert. Antikörper in der Patientenprobe binden an diese Festphasenantigene. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Human IgG zugefügt. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe des chromogenen Substrats PNPP entsteht eine Farbreaktion, die nach 30 Minuten mit einer 3 M NaOH-Lösung abgestoppt und photometrisch ausgewertet wird.

Reagenzien

Maximale Anzahl an Bestimmungen pro Testpackung: 10

Lagern Sie die Reagenzien wie auf dem Label angegeben.

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Mikrowells: die Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit gereinigten spezifischen HLA Klasse II Glykoproteinen. Die gebrauchsfertigen Teststreifen sind farbig markiert und befinden sich in einem wieder verschließbaren Beutel eingeschweißt. |
| TCW | 2. Waschlösungskonzentrat (10 x konzentriert): TRIS –Aminomethan gepufferte Lösung mit Na-Cl ₂ und TWEEN 20; enthält 1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnen. Diese Waschlösung kann bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 7 Tagen bei 2-8°C gelagert werden. |
| SD | 3. Probenverdünnungspuffer: Phosphat gepufferte saline Lösung mit Rinderalbumin und Mausserum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig. |
| SB | 4. Substratpuffer: enthält Diethanolamin, MgCl ₂ und 0,02% Natrium- Azid. Gebrauchsfertig. Dunkel aufbewahren. |
| SS | 5. Stopplösung: 3 M NaOH. Gebrauchsfertig. Mit Vorsicht verwenden! |
| AG | 6. Konjugat: ein mit alkalischer Phosphatase markierter gereinigter Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen humanes G (IgG); enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. |
| PN | 7. PNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat, kristallin. In destilliertem Wasser auflösen und vor Gebrauch mit Substratpuffer verdünnen. Dunkel aufbewahren, |

- | |
|-----------|
| PC |
|-----------|
8. Positives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.
- | |
|-----------|
| NC |
|-----------|
9. Negatives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.
- | |
|-----------|
| PS |
|-----------|
10. Abklebefolien.

Vorsichtsmaßnahmen

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Vermeiden Sie jede Kontaminationen des Verdünnungspuffers und des Konjugats. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Serum führt zur Neutralisation des Konjugats und damit zum Testausfall.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Tests.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die verdünnten Konjugate, Kontrollen und Substrate.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Die enzymatische Substratreaktion im letzten Inkubationsschritt ist temperaturabhängig und sollte bei 22-25°C durchgeführt werden.
- Durch Abweichungen bei den verwendeten Materialien und Geräten und durch Temperaturunterschiede in den Laboratorien kann es sinnvoll sein, die abschließende Inkubationszeit leicht zu erhöhen bzw. zu verringern, um die korrekten Werte für die Kontrollen zu erreichen. Kontrollieren Sie diese Anpassung regelmäßig.

Warnhinweis

- Alle Kontrollen humanen Ursprungs werden auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HB_s-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Einigen Reagenzien ist Natrium-Azid als Konservierungsmittel zugesetzt. Bei Kontakt bitte mit reichlich Wasser spülen. Natrium-Azid ist ein Gift und wirkt im Körper toxisch.
- Die Stopplösung (NaOH) wirkt korrosiv. Vermeiden Sie deshalb jeden Kontakt mit der Haut und den Augen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

Probengewinnung

Entnehmen Sie das Blut ohne Zusatz von Antikoagulantien unter den üblichen aseptischen Bedingungen und verwenden Sie es möglichst frisch, um falsch positive oder negative Ergebnisse durch zu lange Lagerung oder Kontamination der Probe auszuschließen. Die Proben können bei 2-8°C bis zu 48 Std. aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. So können diese Proben bis zu 3 Jahren aufgehoben werden. Lagern Sie die Proben nicht in "No Frost Gefrierschränken"!

Trennen Sie das Serum für die Lagerung oder den Versand von den übrigen Blutbestandteilen.

Partikel oder Ausflockungen in der Probe können zu falsch positiven Ergebnissen oder zu schlechten Doppelbestimmungen führen. Zentrifugieren Sie diese Proben vor ihrer Austestung.

Verwenden Sie ausschließlich humanes Serum für diesen Test. Die Proben dürfen nicht vorverdünnt sein! Dieses führt zu falschen Ergebnissen.

Keine bakteriell verunreinigten, hämolytischen, lipämischen, ikterischen oder Hitze inaktivierten Proben verwenden, um widersprüchliche Ergebnisse zu vermeiden.

Durchführung

Mitgelieferte Materialien:

Die Vials enthalten z.T. mehr Reagenz, als auf dem Label angegeben. Entnehmen Sie deshalb immer die benötigten Mengen für die Verdünnungen mit kalibrierten Pipetten.

1. 5 Halterahmen mit jeweils 10 – 1 x 8 farbig markierten Teststreifen und einer Farbkontrollkarte
2. 1 x 125 ml Waschlösungskonzentrat
3. 1 x 50 ml Probenverdünnungspuffer
4. 1 x 60 ml Substratpuffer
5. 1 x 50 ml Stopplösung
6. 1 x 350 µl Anti-Human IgG Konjugat
7. 5 x 50 mg PNPP Substrat
8. 1 x 0.45 ml positives Kontrollserum
9. 1 x 0.7 ml negatives Kontrollserum
10. 10 Abklebefolien

Zusätzlich benötigte Materialien:

1. Röhrchen für die Verdünnungen der Proben, Kontrollen und Reagenzien
2. Transferpipetten
3. Variable Pipetten: 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl und Einwegspitzen
4. Laborwecker
5. ELISA- Reader mit einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm
6. Destilliertes Wasser
7. Papiertücher
8. ELISA-Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. Wasserbad bei 37°C oder Brutschrank

Testdurchführung

1. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur.
2. Stellen Sie die benötigte Waschlösung her, indem Sie das Waschlösungskonzentrat 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen und gut mischen.

Reagenz	Rahmen 1 2 Proben	Rahmen 2 4 Proben	Rahmen 3 6 Proben	Rahmen 4 8 Proben	Rahmen 5 10 Proben
TCW	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml	125 ml
DI Water	225 ml	450 ml	675 ml	900 ml	1125 ml

3. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Patientenproben fest.

Vorbereitung der Proben und Kontrollen:

4. Verdünnen Sie die Proben und Kontrollen im Probenverdünnungspuffer und mischen Sie gut durch:

Patientenprobe	425 µl
SD	1.275 ml

Reagenz	Rahmen 1 2 Proben	Rahmen 2 4 Proben	Rahmen 3 6 Proben	Rahmen 4 8 Proben	Rahmen 5 10 Proben
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. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen (1 Set pro Probe) aus der Verpackung und verschließen Sie sofort nach Entnahme den Beutel mit den nicht benötigten Streifen.

Hinweis: Positionieren Sie den Rahmen so, dass die Vertiefung A1 oben links ist. Kontrollieren Sie den richtigen Sitz und das Einrasten der Streifen im Rahmen. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen. Behalten Sie diese Positionierung während der Testdurchführung bei.

Vergewissern Sie sich, dass die abgerundeten Enden der Streifen nach dem Einsetzen unten im Rahmen sind und vergewissern Sie sich, dass die Vertiefung A1 vor jeder Reagenzienzugabe oben links im Rahmen ist.

Hinweis: Überprüfen sie die richtige Auswahl und Anordnung der Teststreifen mit der beiliegenden Farbkontrollkarte.

6. Geben Sie 250 µl Waschlösung in jede Vertiefung und lassen Sie die Streifen 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

7. Verwerfen Sie den Inhalt und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

8. Pipettieren Sie 50 µl der verdünnten Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen (siehe Abbildung 1). (Geben Sie das Patientenserum in alle nummerierten Vertiefungen und in die Vertiefungen NA und MO.)

	P	F	W	V	B
A	1	9	17	25	N
B	2	10	18	26	N
C	3	11	19	27	N
D	4	12	20	28	N
E	5	13	21	29	P
F	6	14	22	30	P
G	7	15	23	MO	B
H	8	16	24	NA	B

Abbildung 1

N = Negative Kontrolle
P = Positive Kontrolle
B = Blank
NA = No Antigen
MO = Monoclonal Only

Farbsymbole:

P = rosa
F = pink
W = weiss
V = violett
B = schwarz

Hinweis: Die Blank-Vertiefungen bleiben leer.

Hinweis: Werden pro Testansatz mehrere Patientenproben untersucht, sollten Sie die Streifen beschriften, um Verwechslungen auszuschließen.

9. Versiegeln Sie die Streifen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
10. Verdünnen Sie das Konjugat 1:100 mit dem Probenverdünnungspuffer in einem Polypropylen Röhrchen, um Aktivitätsverluste des Konjugates auszuschließen.

Reagenz	Rahmen 1 2 Proben	Rahmen 2 4 Proben	Rahmen 3 6 Proben	Rahmen 4 8 Proben	Rahmen 5 10 Proben
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

Hinweis: Das Konjugat ist sehr viskos. Ziehen Sie es deshalb vorsichtig auf, und mischen Sie es im Probenverdünnungspuffer gut durch.

11. Waschschrte:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 250 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, daß nach dem letzten Waschschrift alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

12. Geben Sie 50 µl des verdünnten Konjugats in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Blanks.
13. Versiegeln Sie die Streifen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
14. Lösen Sie das kristalline PNPP-Substrat in 500 µl destilliertem Wasser auf und mischen Sie gut durch, indem Sie den Verschuß wieder einsetzen und das Vial gut schütteln. Bitte bis zur weiteren Verwendung vor Licht schützen.
15. Verdünnen Sie das PNPP 1:100 mit dem Substratpuffer.

Reagenz	Rahmen 1 2 Proben	Rahmen 2 4 Proben	Rahmen 3 6 Proben	Rahmen 4 8 Proben	Rahmen 5 10 Proben
PN	90 µl	180 µl	270 µl	360 µl	450 µl
SB	9 ml	18 ml	27 ml	36 ml	45 ml

Gut mischen! Vor Licht schützen.

16. Waschschritte:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 250 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Arbeiten Sie die nächsten 3 Schritte genau ab.

17. Geben Sie 100 µl der verdünnten PNPP-Lösung in jede Vertiefung mit Ausnahme der Blanks.
18. Die Reaktionsansätze im Dunkeln exakt 30 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.

Hinweis: Die Inkubationszeit bzw. -temperatur nach Zugabe des PNPP ist kritisch. Halten Sie sie genau ein, und starten Sie die Zeit mit der Zugabe des PNPP in die erste Vertiefung.

19. 100 µl Stopplösung in gleicher Abfolge wie das Substrat in alle Vertiefungen geben. Füllen Sie die Blanks mit zusätzlichen 100 µl Stopplösung auf.
20. Die Reaktionen werden nach dem Abstoppen im ELISA-Reader bei 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm ausgewertet. Sie können die Teststreifen, wenn die Auswertung nicht sofort nach dem Abstoppen gemacht werden kann, bis zu maximal 30 Minuten im Dunkeln stehen lassen und danach messen.
21. Ziehen Sie die Blank-OD Werte von den Proben und Kontrollen ab. Bei vielen ELISA-Readern läßt sich dieses programmieren.
22. Übertragen Sie Ihre Werte auf den Protokollbogen/Recording Sheet.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle des Quik-ID® Class II besteht aus dem Einsatz positiver und negativer Kontrollen, die bei jeder Probe mitgeführt werden, um die korrekte Durchführung und die Reaktivität der Reagenzien zu bestätigen.

Kriterien für einen validen Test:

	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle
OD Mittelwert	≤ 0.225	≥ 1.000

Interpretation der Ergebnisse

Ermitteln Sie den Cutoff für jede Testvertiefung:

Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion (OD-Wert) der entsprechenden Vertiefung gleich oder größer als ihr cutoff ist.

Durchschnittswert der Vertiefungen mit der negativen Kontrolle (schwarzer Streifen, Vertiefungen A, B, C, und D) x 2 x B.A.F. (Background Adjustment Factor) = Cutoff der Vertiefung.

Die entsprechenden B.A.F. Werte entnehmen Sie bitte dem beiliegenden, chargenabhängigen Quik-ID® Klasse II Recording Sheet.

Berechnung der PRA Prozentanteile:

% PRA (Panel Reaktive Antikörper) = Anzahl der positiven Ergebnisse dividiert durch die Anzahl der Vertiefungen/Wells, die HLA Klasse II Antigene enthalten, multipliziert mit 100.

$$\% \text{ PRA} = \frac{\# \text{ der positiven Ergebnisse}}{\# \text{ der Wells, die HLA Klasse II Antigene enthalten}} \times 100$$

Einschränkungen

Kontaminationen der Reagenzien, falsche Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, unzureichendes Waschen und Ausklopfen der Vertiefungen, falsche Volumina, Streulicht bei der Substratinkubation, oder Auslassung von Schritten bei der Abarbeitung führen zu falschen Ergebnissen.

Das Vorhandensein von Immunkomplexen oder anderen Immunglobulin Aggregaten in der Patientenprobe kann zu unspezifischen Bindungen und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Alle Ergebnisse sollten immer mit weiteren serologischen Tests und dem klinischen Bild abgesichert werden.

Schwache Titer oder Antikörper geringer Avidität oder seltener Ausprägung werden u.U. nicht erfaßt und können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Vertiefung "No Antigen Well" = NA in Position H auf dem violetten Streifen enthält keinen monoklonalen Antikörper gerichtet gegen HLA Glykoproteine und dient dem Nachweis unspezifischer Bindungen.

Die Vertiefung "Monoclonal Only" = MO in Position G auf dem violetten Streifen enthält nur einen monoklonalen Mausantikörper. Reaktionen in dieser Vertiefung weisen auf Kreuzreaktionen mit dem Capture-Antikörper auf der festen Phase, auf einen Maus IgG-Antikörper oder auf störende Immunkomplexe in der Probe hin.

Patientenproben mit höheren Extinktionen (OD-Werten) in der Vertiefung NA "No Antigen Well" und/oder in der Vertiefung MO "Monoclonal Only Well" als der cutoff-Wert der negativen Kontrolle, sollten mit einer anderen Methode nachgetestet werden.

Nicht HLA-Lymphozytotoxische Antikörper werden im Test nicht erfaßt.

IgM, IgA, oder HLA Klasse I Antikörper werden im Test nicht erfaßt.

Einige nicht zytotoxische HLA-Antikörper, die im LCT nicht reaktiv sind, werden im ELISA erfaßt.

Dieses Produkt dient dem Nachweis von HLA Antikörpern, die gegen die gelisteten Antigene gerichtet sind. (Siehe auch das chargenabhängige Recording Sheet.) Antikörper gegen nicht gelistete Antigene werden nicht erfaßt.

Spezifische Charakteristika der Durchführung

Bei korrekter Lagerung und Anwendung wie oben beschrieben dient dieser Test dem Nachweis von Antikörpern gegen HLA Klasse II Antigene wie auf dem beiliegenden Protokollbogen/Recording Sheet aufgeführt.

Um die Reaktivität und Spezifität zu garantieren, wird jede Charge des Quik-ID® Class II mit bekannten Seren, die Alloantikörper enthalten und mit den auf der festen Phase beschichteten HLA Klasse II Antigenen (siehe Protokollbogen) reagieren, wie auch mit Proben, die diese Antikörper nicht enthalten.

Evaluation

Vergleichende Methode

Quik-ID®Class II		Positiv	Negativ	Gesamt
	Positiv	45	3	48
	Negativ	3	36	39
	Gesamt	48	39	87

Übereinstimmung: 93.1 %

Co-Positivität: 93.7% Co-Negativität: 92.3%

Vergleichende Methode: Durchflußzytometrie

Referenzliteratur

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 oder 1-800-233-1843

Quik-ID®Class II

- **Zum in-vitro Gebrauch**
- **Lagerung bei 2-8°C**



REF

C2ID

Rev. 2007-08-07 (G)

EC REP

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

www.gtidiagnostics.com