

Quik-ID® Class II

USO

Quik-ID® Class II è un (ELISA) in fase solida preparato per determinare anticorpi HLA Pannello Reattivi (PRA) di classe II IgG.

Per uso diagnostico in vitro.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il sistema antigenico HLA è il maggior responsabile della sopravvivenza dell'organo nel trapianto allogenico o nella trasfusione piastrinica in pazienti sensibilizzati.¹ Gli anticorpi anti HLA possono essere acquisiti attraverso alloimmunizzazione da gravidanza, trasfusione o trapianti precedenti. In generale, l'alloimmunizzazione porta alla produzione di anticorpi anti HLA in circa il 33% degli individui esposti.²

Il kit ELISA in fase solida Quik-ID® Class II fornisce glicoproteine HLA di classe II ottenute da linee cellulari di linfociti B da EBV trasformate, ognuna di esse è immobilizzata in diversi pozzetti mediante un anticorpo monoclonale. Gli antigeni HLA di class II sono tipizzati ed ogni tipizzazione è indicata sulla Recording Sheet.

Il kit ELISA in fase solida Quik-ID® Class II è prodotto per essere usato in unione al test di screening B-SCREEN®. I campioni riscontrati positivi allo screening possono essere ulteriormente testati con il Quik-ID® Class II per determinare il valore di PRA e la specificità.

PRINCIPIO

Il siero paziente è aggiunto a microstrip rivestite con glicoproteine HLA di classe II per permette agli anticorpi di legarsi, se presenti. Anticorpi non legati vengono lavati. Si dispensa l'antiglobulina umana coniugata con fosfatasi alcalina (Anti-IgG) ad ogni pozzetto e si incuba. Il coniugato Anti-IgG 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: 10

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

- | | |
|------------|---|
| MS | 1. Strip: microstrip a fondo piatto a cui sono state glicoproteine HLA di classe II. I microstrip sono colorati e chiusi in busta risigillabile. Pronti 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. |
| AG | 6. Coniugato: anti globulina umana di capra coniugata con Fosfatasi alcalina G (IgG). 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. |
| PS | 10. Copripietra. |

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 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 dei 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 senza anticoagulante usando una tecnica asettica e dovrebbe essere testato fresco per minimizzare il rischio di ottenere reazioni falsamente positive o negative a causa della conservazione errata o della contaminazione dei campioni. I campioni che non possono essere immediatamente testati 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 e poi congelarli.

Il siero 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. 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. Misurare i reagenti con pipette appropriate quando si preparano le diluizioni.

1. 5 porta strip, contenenti ciascuno 10 – strip 1 x 8 colorati e una cartolina colorata
2. 1 x 125 mL Soluzione Concentrata
3. 1 x 50 mL Diluente Campioni
4. 1 x 60 mL Tampone Substrato
5. 1 x 50 mL Soluzione Stoppante
6. 1 x 350 µL Coniugato Umano Anti-IgG
7. 5 x 50 mg Substrato PNPP
8. 1 x 0.45 mL Siero Controllo Positivo
9. 1 x 0.7 mL Siero Controllo Negativo
10. 10 Copripiastre

Ulteriori Materiali Richiesti:

1. Provette per campioni, controlli e diluizioni
2. Pipette
3. Micropipette graduate per dispensare 10 – 100 µL e 100 – 1000 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.

Reagenti	1 Piastra (2 Campioni)	2 Piastre (4 Campioni)	3 Piastre (6 Campioni)	4 Piastre (8 Campioni)	5 Piastre (10 Campioni)
TCW	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL	125 mL
Acqua Deionizzata	225 mL	450 mL	675 mL	900 mL	1125 mL

3. Calcolare il numero dei campioni da testare.

PREPARARE CAMPIONI E CONTROLLI

4. Diluire come segue e miscelare bene:

Campioni Pazienti	425 µL
SD	1.275 mL

Reagenti	1 Piastra (2 Campioni)	2 Piastre (4 Campioni)	3 Piastre (6 Campioni)	4 Piastre (8 Campioni)	5 Piastre (10 Campioni)
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. Ogni campione richiede un set di strip colorati. Rimuoverli velocemente e risigillare i rimanenti strip nella busta protettiva.

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.

Assicurarsi che la parte arrotondata dello strip sia nella parte inferiore del supporto. Prima di aggiungere i reagenti assicurarsi che il pozzetto A1 sia posizionato in alto in corrispondenza dell'angolo sinistro del supporto.

NOTA: Assicurarsi che l'ordine degli strip posizionati nel supporto corrisponda alla sequenza indicata sulla cartolina colorata.

6. Aggiungere 250 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 nella figura 1. Dispensare il siero paziente a tutti i pozzetti numerati ed ai pozzetti NA e MO.

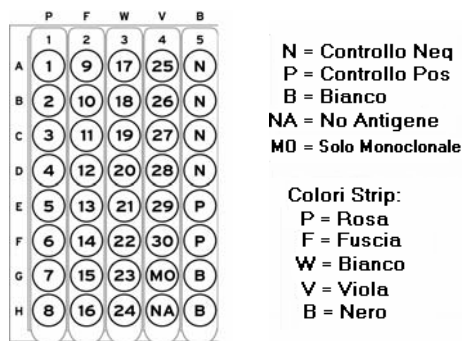


Fig. 1

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

NOTA: Se si testano più campioni in una sola seduta, IDENTIFICARE GLI STRIP PER EVITARE ERRORI.

9. Coprire la piastra ed incubare per 30-35 minuti 37°C a 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.

Reagenti	1 Piastra (2 Campioni)	2 Piastre (4 Campioni)	3 Piastre (6 Campioni)	4 Piastre (8 Campioni)	5 Piastre (10 Campioni)
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

NOTA: Il coniugato è viscoso. Aspirare 2-3 volte nella provetta prima di dispensare e sciacquare bene il puntale nel diluente. Miscelare bene.

11. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 250 μL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- e) Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

NOTA: È 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.

Reagenti	1 Piastra (2 Campioni)	2 Piastre (4 Campioni)	3 Piastre (6 Campioni)	4 Piastre (8 Campioni)	5 Piastre (10 Campioni)
PN	90 μL	180 μL	270 μL	360 μL	450 μL
SB	9 mL	18 mL	27 mL	36 mL	45 mL

Miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.

16. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 250 μL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- e) 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. Stoppare la reazione dispensando 100 μL di soluzione stoppante ad ogni pozzetto nella stessa sequenza in cui si è 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 sul foglio di lavoro.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il controllo di qualità Quik-ID® Class II è 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	≤ 0.225	≥ 1.000

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolare il valore di cutoff per ogni campione come segue:

Media dei Controlli Negativi (Pozzetti A, B, C, & D dello strip Nero) X 2 X Background Fattore di Aggiustamento (vedi Foglio di Lavoro) = Valore Cutoff per pozzetto

Risultati con valori di DO uguali o superiori a valore di cutoff sono considerati positivi.

Calcolare il PRA (Anticorpi Pannello Reattivi) come segue:

$$\% \text{ PRA} = \frac{\# \text{ dei Risultati Positivi}}{\# \text{ dei pozzetti contenuti gli antigeni HLA di classe II}} \times 100$$

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 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.

Il pozzetto senza Antigene (pozzetto H strip viola) non contiene anticorpi monoclonali né glicoproteine HLA ed è usato per determinare legami non-specifici.

Il pozzetto «Solo Monoclonale» (pozzetto G strip viola) contiene solo l'anticorpo monoclonale murino. La positività di questo pozzetto può essere dovuta alla reattività con l'anticorpo, alla presenza di anticorpo di topo IgG, o alla presenza di immuno complessi.

Campioni paziente che danno valori più alti «Pozzetto Non Antigene» e/o «Pozzetto Solo Monoclonale» del valore di cutoff dei controlli negativi dovrebbero essere testati con altri metodi.

Anticorpi non-HLA linfocitotossici non sono determinati da questo test.

Questo prodotto non determina anticorpi IgM, IgA, o anticorpi HLA di classe I.

Alcuni HLA non-citotossici possono essere determinati da questo test e non nel test di linfocitotossicità (LCT).

Questo prodotto determina anticorpi HLA diretti verso gli antigeni rappresentati nel pannello. (Vedi Foglio di Lavoro lotto specifico.) Anticorpi verso antigeni non rappresentati possono non essere determinati.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST

Quando correttamente conservato ed usato in accordo alla procedura descritta, questo prodotto può determinare anticorpi anti-HLA di classe II IgG della specificità indicata sul Foglio di Lavoro.

Per garantire reattività e specificità ogni lotto di Quik-ID® Class II é testato prima della commercializzazione con campioni contenenti alloanticorpi reattivi con antigeni HLA di classe II indicati sul foglio di lavoro incluso così come campioni privi di anticorpi.

Valutazione del Test

Metodo di Confronto

Quik-ID® Class II		Metodo di Confronto		Totale
		Positivo	Negativo	
	Positivo	45	3	48
	Negativo	3	36	39
	Totale	48	39	87

Concordanza: 93.1%

Co-positività: 93.7% Co-negatività: 92.3%

Metodo di Confronto: Biglie-Basato Sulla Cifluorimetria

REFERENZE

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.™

Quik-ID® Class II

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

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

REF C2ID

Rev. 2007-08-07 (I)



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

www.gtidiagnostics.com