

Quik-ID® Class II

PROPÓSITO DE EMPLEO

Quik-ID® Class II es un ensayo cualitativo en fase sólida inmuno-enzimático (ELISA) diseñado para detectar Anticuerpos IgG panel reactivos (PRA) a antígenos HLA clase II.

Para Uso en Diagnóstico *In Vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

HLA es un sistema antigénico mayor en determinar la supervivencia de trasplantes alografos o transfusión de plaquetas en individuos sensibilizados.¹ Los anticuerpos HLA se pueden adquirir por aloinmunización como resultado de embarazo, transfusión de derivados sanguíneos, o trasplantes previos. En general, la aloinmunización lleva a la producción de anticuerpos HLA en aproximadamente el 33% de individuos expuestos.²

Quik-ID® Clase II ELISA en fase sólida contiene glicoproteínas HLA clase II obtenidas de líneas celulares de linfocitos B de EBV, cada uno inmovilizado en diferentes microcubetas por medio de un anticuerpo monoclonal. El Tipo de HLA clase II de cada línea celular y el número del pocillo conteniendo cada antígeno se encuentra en la Tabla de Resultados.

Quik-ID® Clase II ELISA en fase sólida está diseñado para usarse en combinación con B-SCREEN®. Las muestras previamente identificadas como positivas en el ensayo de screening pueden analizarse posteriormente con Quik-ID® Class II para determinar un valor PRA y/o especificidad.

PRINCIPIO

Se añade suero a microcubetas tapizadas con glicoproteínas HLA clase I permitiendo, si estuviera presente, que el anticuerpo se enlace. Los anticuerpos no ligados se eliminan por lavado. Se añade a los pocillos un reactivo anti-inmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (Anti-IgG) y se incuba. La Anti-IgG no ligada se elimina por lavado y se añade el sustrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Tras un periodo de incubación de 30 minutos, se para la reacción añadiendo una solución de hidróxido sódico. Con un espectrofotómetro se mide la densidad óptica del color desarrollado.

REACTIVOS

Número máximo de test por kit: 10

Los reactivos deben conservarse según las instrucciones de la etiqueta.

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Microcubetas: tiras de microcubetas de fondo plano a las cuales se han inmovilizado glicoproteínas HLA clase II. Las tiras de las microcubetas están codificadas por colores y están dentro de bolsa embalaje reutilizables. Listo para el uso. |
| TCW | 2. Solución Concentrada de Lavado (10x): Solución tamponada de Tris (hidroximetil) aminometano conteniendo cloruro sódico y Tween 20. 1% azida sódica. Diluir con agua desionizada o destilada antes del uso. Almacenar la solución de trabajo de Lavado hasta 48 horas a temperatura ambiente o hasta siete días entre 2 y 8°C. |
| SD | 3. Diluyente de Muestra: Solución salina tamponada de Fosfato conteniendo albúmina bovina y suero de ratón. 0.1% azida sódica. Lista para el uso. |
| SB | 4. Tampón Substrato: Esta solución contiene dietanolamina y cloruro magnésico. 0.02% azida sódica. Listo para el uso. Proteger de la luz. |
| SS | 5. Solución de Paro: Hidróxido Sódico 3 M. Listo par el uso. Manipular con cuidado. |
| AG | 6. Conjugado: Anticuerpo de cabra a Inmunoglobulina G Humana purificado por afinidad conjugado con Fosfatasa Alcalina (IgG). 0.1% azida sódica. Diluir con Diluyente de Muestra antes del uso. |
| PN | 7. PNPP (p-nitrofenil fosfato) Substrato: Polvo Cristalino. Reconstituir con agua desionizada o destilada y diluir en tampón de Substrato antes del uso. Proteger de la luz. |

- PC** 8. Suero Control Positivo: Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar.
- NC** 9. Suero Control Negativo: Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar.
- PS** 10. Tapas para placas.

PRECAUCIONES

- No utilizar reactivos turbios o contaminados.
- SE DEBE tener cuidado de evitar la contaminación del Diluyente de Muestra y del Conjugado. La contaminación inadvertida de estos reactivos con suero humano provocaría la neutralización del Conjugado y el fallo de la prueba.
- No usar reactivos después de su fecha de caducidad.
- Las microcubetas y los reactivos contenidos en el kit no pueden usarse en otros kits de otros sistemas.
- La sustitución de los componentes suministrados en el kit por cualquier otro puede provocar resultados erróneos o inconsistentes.
- Después de cada serie de análisis desechar los restos no utilizados de Conjugado diluido, Controles positivo y negativo diluidos, y reactivo PNPP diluido y reconstituido.
- Seguir las instrucciones del fabricante de las pipetas en cuanto a aspiración y dispensación para la preparación correcta de las diluciones.
- La reacción Enzima sustrato de la última incubación es sensible a la temperatura y debería realizarse entre 22 y 25°C.
- Puede ser necesario que el laboratorio establezca tiempos de incubación más largos o más cortos, debido a las variaciones en instrumentos o en la temperatura de la habitación para obtener resultados de controles consistentemente válidos. Debido a que la temperatura de la incubación final puede afectar a los valores de los controles, es importante monitorizar periódicamente la temperatura de la habitación.

CUIDADO

- Todos los sueros humanos utilizados en los Controles Positivo y Negativo para este producto han sido testados y encontrados negativos para los anticuerpos a HIV, HCV y HBsAg mediante métodos aprobados por la FDA. De todas formas ninguna prueba puede ofrecer completa seguridad de ausencia de virus de HIV, Hepatitis C, Hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por tanto, estos materiales deberían manipularse como potencialmente infecciosos.
- Algunos de los reactivos del kit contienen azida sódica como conservante.
ATENCIÓN: La azida sódica reacciona con las cañerías de cobre y plomo formando azidas metálicas latamente explosivas. Cuando se desechen en el fregadero deberá enjuagarse con gran cantidad de agua para prevenir el crecimiento de azidas. La azida sódica es un veneno y es tóxica si se ingiere.
- La solución de paro (NaOH) es corrosiva. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Las salpicaduras deberían lavarse inmediatamente.
- Al terminar desechar todos los componentes siguiendo la normativa local.

TOMA DE MUESTRA

La sangre se debe recolectar sin anticoagulante utilizando la técnica aséptica y debería analizarse fresca lo antes posible para minimizar la posibilidad de obtener reacciones falsos positivos o falsos negativos debido al deficiente almacenaje o contaminación de la muestra. Las muestras que no puedan analizarse de forma inmediata deberían almacenarse a 2 y 8°C por no más de 48 horas o congelarlas. Las muestras congeladas a -20°C o inferior, permanecen en buenas condiciones por varios años (2-3 años). De todas formas, para evitar el efecto nocivo de repetidos ciclos descongelación/congelación, se recomienda alicuotar las muestras en pequeños volúmenes y conservarlas congeladas. Evitar los congeladores antiescarcha.

Para almacenamiento o transporte, el suero debe ser separado de las células rojas.

Las partículas o agregados en la muestra pueden provocar falsos positivos o poca repetibilidad. Las muestras conteniendo partículas deberán aclararse por centrifugación antes de analizarlas.

Para este test solo puede usarse suero humano completo. La dilución previa de las muestras en cualquier forma no normal, suero humano negativo ELISA podría afectar al resultado.

Las muestras contaminadas por microorganismos, hemolizadas, lipémicas, ictéricas o inactivadas por calor pueden dar resultados inconsistentes y deberían evitarse.

PROCEDIMIENTO

Materiales Suministrados:

Los viales pueden contener más reactivo que el indicado en las etiquetas. Al preparar las soluciones, asegurarse de medir el reactivo con los instrumentos apropiados.

1. 5 Marcos de microcubeta, conteniendo cada uno 10 – 1 x 8 tiras codificadas por color y una tarjeta decodificadora
2. 1 x 125 mL Soluc. Conc. Lavado
3. 1 x 50 mL Diluyente de Muestra
4. 1 x 60 mL Tampón Substrato
5. 1 x 50 mL Solución de Paro
6. 1 x 350 µL Conjugado Anti- IgG Humana
7. 5 x 50 mg PNPP Substrato
8. 1 x 0.45 mL Suero Control Positivo
9. 1 x 0.7 mL Suero Control Negativo
10. 10 Tapas para Placas

Material Necesario Adicionalmente:

1. Tubos para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos
2. Pipetas de transferencia
3. Micropipetas ajustables para dispensar 10 – 100 µL y 100 – 1,000 µL y puntas desechables
4. Cronómetro
5. Lector de microplacas capaz de medir DO a 405 o 410 y 490 nm
6. Agua desionizada o destilada
7. Toallitas papel absorbente
8. Lavador de microplacas o similar
9. Centrifuga capaz de separar suero o plasma de las muestras de paciente
10. Baño de agua de 37°C o incubador

Procedimiento del Test

1. Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.
2. Prepara la Solución de Lavado diluyendo el concentrado de lavado. Añadir 1 volumen de Concentrado de Lavado a 9 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.

Reactivos	1 Placa (2 Muestras)	2 Placas (4 Muestras)	3 Placas (6 Muestras)	4 Placas (8 Muestras)	5 Placas (10 Muestras)
TCW	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL	125 mL
Agua Desionizada	225 mL	450 mL	675 mL	900 mL	1,125 mL

3. Determinar el número de muestras a testar.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES

4. Diluir como sigue y mezclar bien:

Muestra Paciente	425 µL
SD	1.275 mL

Reactivos	1 Placa (2 Muestras)	2 Placas (4 Muestras)	3 Placas (6 Muestras)	4 Placas (8 Muestras)	5 Placas (10 Muestras)
NC	120 µL	250 µL	350 µL	450 µL	550 µL
SD	360 µL	750 µL	1,050 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. Cada muestra requiere de un set de tiras codificadas por color. Sacar rápidamente y guardar las tiras que no se vayan a emplear en la bolsa protectora.

NOTA: Orientar el marco con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Asegurarse de que todas las tiras están correctamente situadas y encajadas en el marco. Etiquetar o enumerar cada tira para evitar errores. Mantener la misma orientación de la placa durante todo el test.

Asegurarse de que la parte redondeada de la etiqueta que se sitúa sobre cada tira está en el borde más bajo del marco. Antes de la adición de los reactivos, cerciorarse de que el pocillo A1 está situado en el extremo superior izquierdo del marco.

NOTA: Asegúrense de que concuerden el orden de las tiras en el marco con el orden indicado en la hoja de códigos de color.

6. Añadir 250 µL de Solución de Lavado de trabajo a todos los pocillos y dejar que alcance la temperatura ambiente en 5-10 minutos.
7. Aspirar o decantar vigorosamente e invertir sobre un papel absorbente para evitar que se seque.
8. Añadir 50 µL del control apropiado o muestra en las cubetas, tal como designe en el dibujo 1. Añadir suero de paciente a todas las pocillos numeradas y las NA y MO pocillos.

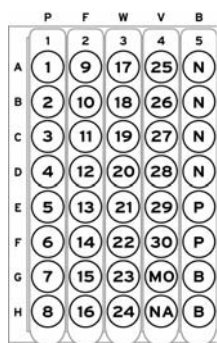


Fig. 1

N = Control Neg
P = Control Pos
B = Blanco
NA = No Antígeno
MO = Solo Monoclonal

Letras para los Colores:

P = Rosa
F = Fucsia
W = Blanco
V = Violeta
B = Negro

NOTA: No añadir ni muestras ni reactivos a las cubetas de blanco.

NOTA: Si se analizan múltiples muestras de pacientes al mismo tiempo, PARA EVITAR ERRORES MARCAR CADA UNA DE LAS TIRAS.

9. Sellar las microcubetas con una tapa para placas e incubar por 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. En caso de utilizar un incubador seco aumentar 10 minutos el tiempo de incubación.
10. Diluir el Conjugado 1 a 100 en Diluyente de Muestra. Utilizar un contenedor de polipropileno.

Reactivos	1 Placa (2 Muestras)	2 Placas (4 Muestras)	3 Placas (6 Muestras)	4 Placas (8 Muestras)	5 Placas (10 Muestras)
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: El conjugado es viscoso. Mojar la punta de pipeta 2-3 veces en el Conjugado antes de dispensar y enjuagar después de la adición al Diluyente de Muestra. Mezclar bien.

11. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 250 μL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

NOTA: Es importante eliminar completamente toda la solución de Lavado después del último lavado.

- Añadir 50 μL de Conjugado diluido (preparado en el paso previo) a todos los pocillos EXCEPTO los designados como BLANCOS.
- Sellar las microcubetas con una Tapa para placas e incubar 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. Si se usa un incubador seco debe aumentarse en 10 minutos el tiempo de incubación.
- Disolver el Substrato PNPP añadiendo 0.5 mL de agua desionizada o destilada al vial. Volver a tapar y mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.
- Diluir el PNPP 1 a 100 en el Tampón de Substrato.

Reactivos	1 Placa (2 Muestras)	2 Placas (4 Muestras)	3 Placas (6 Muestras)	4 Placas (8 Muestras)	5 Placas (10 Muestras)
PN	90 μL	180 μL	270 μL	360 μL	450 μL
SB	9 mL	18 mL	27 mL	36 mL	45 mL

Mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

16. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 250 μL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

Proceder rápidamente con los siguientes tres pasos.

- Añadir 100 μL de la solución de PNPP diluida a todos los pocillos EXCEPTO aquellos designados como BLANCOS.
- Dejar atemperar las microcubetas en oscuridad por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE (22 y 25°C).

NOTA: Después de la adición de PNPP el tiempo de incubación y la temperatura son críticos. NO VARIAR el tiempo de incubación establecido o la temperatura. Para mayor consistencia empezar a medir el tiempo después de la adición del reactivo a la primera cubeta.

- Parar la reacción añadiendo 100 μL de Solución de Paro a cada pocillo en la misma secuencia que la adición del sustrato. Añadir 200 μL de Solución de Paro a los pocillos de blanco.
- Leer la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 o 410 nm utilizando un filtro de referencia de 490 nm. Si no se puede leer el resultado inmediatamente, volver a poner los pocillos en oscuridad hasta un máximo de 30 minutos.
- Restar los valores obtenidos en los pocillos BLANCOS a todos los de las muestras y controles. Muchos lectores de ELISA están programados para realizar este paso automáticamente.
- Registrar los Resultados en la Tabla de Resultados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control de calidad del Quik-ID® Class II está integrado en el sistema por la inclusión de los Sueros Control Negativo y Positivo. Estos controles deben incluirse en cada muestra para ayudar a determinar si se han producido errores técnicos o fallos del reactivo.

Criterios para un test válido:

	Control Negativo	Control Positivo
Media DO	≤ 0.225	≥ 1.000

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Calcular el valor de cutoff para cada pocillo individual como sigue:

Media de cubetas Control Negativas (Pocillos A, B, C, y D de tira negra) $\times 2 \times$ Valor de base Factor de Ajuste = Valor Cutoff para el pocillo (Ver Tabla de Resultados)

Resultados con valores de DO iguales o mayores que el valor de cutoff se consideran positivos.

Calcular el porcentaje PRA (Anticuerpo Reactivo Panel) como sigue:

$$\% \text{ PRA} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de Resultados Positivos}}{\text{n}^\circ \text{ de pocillos conteniendo antígeno HLA clase II}} \times 100$$

LIMITACIONES

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana del material, períodos de incubación inadecuados, lavado o decantado inadecuado de los pocillos, exposición del sustrato a la luz, omisión de reactivos, exposición a temperaturas superiores o inferiores a las requeridas, u omisión de pasos.

La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas en la muestra del paciente puede provocar un aumento de uniones no específicas y producir falso-positivos en esta prueba.

Los resultados de este análisis no deberían usarse como única base para una decisión clínica.

Algunos anticuerpos de títulos bajos, baja avidéz pueden no detectarse utilizando este ensayo.

El Pocillo No Antígeno (pocillo H de tira violeta) no contiene anticuerpo monoclonal o glicoproteínas HLA y se usa para detectar uniones inespecíficas. Las muestras de Pacientes que dan valores más altos en el “Pocillo No Antígeno” que el valor de cutoff del control negativo deberían analizarse por otro método.

Los anticuerpos limfocitotóxicos no-HLA no se detectarán utilizando esta prueba.

Este producto no detecta IgM, IgA, o anticuerpos HLA clase I.

Por esta técnica se pueden detectar algunos anticuerpos HLA no-citotóxicos que no reaccionan en el ensayo de linfocitotoxicidad (LCA).

Este producto se espera que detecte anticuerpos HLA a antígenos representados en el panel. (Ver Tabla de Resultados específica del lote.) No se detectarán anticuerpos a antígenos no indicados.

El pocillo “Solo Monoclonal” (pocillo G en la tira violeta) contiene únicamente anticuerpo monoclonal murino. En este pocillo la Reactividad puede ser debida al anticuerpo de captura del sistema, a la presencia de anticuerpos a IgG de ratón, o a los inmunocomplejos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICO

Cuando se almacena adecuadamente y se utiliza de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, este producto puede detectar anticuerpos a antígenos HLA clase II identificados en la Tabla de Resultados adjunta.

Para asegurar la adecuada reactividad y especificidad, antes de comercializar cada lote de Quik-ID® Class II se prueba con muestras conocidas en contener aloanticuerpos. Reactivos con antígenos HLA clase I identificados en la Tabla de Resultados adjunta. Así como con muestras conocidas de estar libres de tales anticuerpos.

Evaluación de Rendimiento

Método Comparativo

Quik-ID® Class II		Positivo	Negativo	Total
		Positivo	45	
	Negativo	3	36	39
	Total	48	39	87

Acuerdo: 93.1%

Co-positividad: 93.7% Co-negatividad: 92.3%

Método Comparativo: Citomertría de Flujo Basada en Partículas

REFERENCIAS

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 o 1-800-233-1843

REF C2ID

Rev. 2007-08-07 (S)



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

www.gtidiagnostics.com

Quik-ID® Class II

- PARA USO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- ALMACENAR A 2 y 8°C

