

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

UTILISATIONS PRÉVUES

MICROAMS® est un essai qualitatif par la méthode ÉLISA (enzyme linked immunosorbent assay) en phase solide conçu pour détecter des anticorps IgG dirigés contre des antigènes HLA de classe I et de classe II provenant de donneurs spécifiques.

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 sensibilisés¹. 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 anti-HLA chez approximativement 33% des individus exposés². Les molécules HLA de classe I et de classe II sont des glycoprotéines membranaires polymorphiques. Il a été démontré que la présence d'anticorps contre les antigènes HLA est un facteur de contre-indication du succès d'une transplantation.³⁻⁶ Le suivi de ces anticorps après la transplantation est important pour l'évaluation de la survie de la greffe.^{7,8}

PRINCIPE

Les glycoprotéines HLA sont préparées à partir des lymphocytes en solubilisant les cellules avec un détergent non ionique. Une fois solubilisés, les lysats de lymphocytes sont ajoutés aux micropuits auxquels des anticorps monoclonaux spécifiques pour les molécules HLA de classe I ou de classe II ont été immobilisés. Les glycoprotéines HLA peuvent ainsi se lier aux anticorps monoclonaux et les glycoprotéines non liées sont lavées. Les micropuits contenant des glycoprotéines liées sont testés avec du sérum humain pour détecter des anticorps contre des molécules HLA. Les anticorps non liés sont alors lavés. Un réactif anti-globuline humaine (anti-IgG) conjugué à la phosphatase alcaline est ajouté aux puits et incubé. L'anti-IgG non lié est lavé et le substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate) est ajouté. Après une incubation de 30 minutes, la réaction est arrêtée par une solution d'hydroxyde de sodium. La densité optique de la couleur qui se développe est mesurée au spectrophotomètre.

Ce coffret utilise trois systèmes de contrôle:

Le premier système est composé de lymphocytes séchés (contrôle lymphocytes séchés) et d'un anticorps connu pour réagir avec les glycoprotéines de classe I et de classe II présentes sur les lymphocytes (sérum contrôle positif). Les lymphocytes séchés sont réhydratés et solubilisés pour donner un lysat. Le lysat est appliqué aux puits réservés pour le contrôle de réactif. Le sérum contrôle positif est testé contre le lysat contrôle pour confirmer que le tampon de lyse lymphocytaire et les autres réactifs de l'analyse agissent de façon appropriée.

Le deuxième système de contrôle est composé de deux anticorps monoclonaux conjugués à la phosphatase alcaline. Un est dirigé contre les glycoprotéines HLA de classe I (réactif contrôle de lysat classe I). L'autre est dirigé contre les glycoprotéines HLA de classe II (réactif contrôle de lysat classe II). Lorsqu'il est testé directement sur les glycoprotéines capturées dans les puits, ce réactif donnera un résultat positif, démontrant ainsi que des molécules HLA de classe I ou HLA de classe II ont été capturées dans les puits.

Le troisième système de contrôle est le contrôle négatif. Les réactions positives sont indiquées par les puits tests dont la valeur est deux fois plus grande que la valeur moyenne des puits Contrôle Négatif.

COMPOSITION DU COFFRET

Nombre maximum de tests par coffret: 44

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

- | | |
|------------|---|
| MS1 | 1. Micropuits: barrettes avec micropuits de faible volume à fond plat auxquels sont attachés des anticorps monoclonaux spécifiques pour HLA de classe I (code couleur bleue) et HLA de classe II (code couleur |
| MS2 | 2. pourpre). Prêt à l'emploi. |
| TCW | 3. Solution de lavage concentrée (10x): solution tamponnée de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane contenant du chlorure de sodium, du Tween 20 et 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 température ambiante ou jusqu'à 7 jours à une température de 2 à 8°C. |

- | | |
|-------------|---|
| SD | 4. Tampon pour échantillon: solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine bovine, du sérum de souris et 0,1% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. |
| SB | 5. Tampon de substrat: Cette solution contient du diéthanolamine, du chlorure de magnésium et 0,02% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. Protéger de la lumière. |
| SS | 6. Solution d'arrêt: Hydroxide de sodium 3M. Prêt à l'emploi. Employer avec précaution. |
| AG | 7. Conjugué (100X): Immunoglobuline de chèvre (IgG) anti-humaine couplée à la phosphatase alcaline et 0,1% d'azide de sodium. (Capuchon de couleur blanc). Diluer dans le tampon de lysant et conjugué avant utilisation. |
| LCD | 8. Tampon de lysat et conjugué: Solution tamponnée au tris contenant du chlorure de sodium et 0,05% d'azide de sodium. (Capuchon de couleur bleu). Prêt à l'emploi. |
| LLB | 9. Tampon de lyse lymphocytaire (10X): Saline tamponnée au tris contenant un détergent non ionique et 0,5% d'azide de sodium. Diluer dans de l'eau déionisée ou distillée avant utilisation. |
| LCRI | 10. Réactif contrôle de lysat classe I (LCRI) (100X): Immunoglobuline de souris (IgG) anti-humaine couplée à la phosphatase alcaline spécifique de la glycoprotéine HLA de classe I, et 0,1% d'azide de sodium. (Capuchon de couleur bleu). Diluer dans le tampon de lysat et conjugué avant utilisation. |
| LCR2 | 11. Réactif contrôle de lysat classe II (LCRII) (100X): Immunoglobuline de souris (IgG) anti-humaine couplée à la phosphatase alcaline spécifique de la glycoprotéine HLA de classe II, et 0,1% d'azide de sodium. (Capuchon de couleur pourpre). Diluer dans le tampon de lysat et conjugué avant utilisation. |
| DLC | 12. Culot de contrôle de lymphocytes séchés: Lymphocytes séchés. A préparer suivant les instructions. |
| PN | 13. 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 | 14. Sérum contrôle positif (4X): sérum humain. 0.1% d'azide de sodium. Diluer avec le tampon pour échantillon avant utilisation. |
| NC | 15. Sérum contrôle négatif (4X): sérum humain. 0.1% d'azide de sodium. Diluer avec le tampon pour échantillon avant utilisation. |
| PS | 16. Scellants pour plaques |

PRÉCAUTIONS

- Ne pas utiliser de réactifs qui sont troubles ou contaminés.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- La substitution de composantes autres que celles fournies dans ce coffret peut entraîner des résultats incohérents ou erronés. Cependant, chaque lot de tampon de lyse lymphocytaire GTI peut être utilisé pour préparer des lysats.
- Les micropuits et les réactifs inclus dans ce coffret ne doivent pas être utilisés conjointement avec un autre ensemble de test.
- Lors de la préparation des dilutions, pipeter selon les instructions du fabricant afin d'assurer des techniques de distribution et de rinçage appropriées.
- Des pipettes calibrées correctement doivent être utilisées pour l'addition des réactifs.
- L'agglutination des lymphocytes avant la lyse peut engendrer une mauvaise préparation de lysat et causer de faibles valeurs lorsqu'il est testé avec le réactif contrôle de lysat. Il est important de traiter les cellules en douceur pour éviter leur agglutination. Une contamination de la préparation des lymphocytes avec des cellules rouges peut diminuer la quantité de glycoprotéines HLA dans le lysat, si elles ne sont pas enlevées avant l'estimation du volume de cellules.
- La centrifugation à des vitesses plus élevées que celles recommandées peut causer la lyse prématurée, l'agglutination et la perte de lymphocytes.
- Les lysats peuvent être conservés à -70 à -80°C avant utilisation. Les lysats ne peuvent pas être re-congelés.

- Prendre des précautions pour éviter la contamination du tampon de lysat et conjugué, des réactifs LCRI, LCR II, et du conjugué. Une contamination involontaire de ces réactifs avec du sérum humain entraînera la neutralisation du conjugué, des réactifs LCRI ou LCR II et ainsi l'échec du test.
- Après chaque essai, jeter de toutes portions inutilisées de conjugué dilué, du tampon de lyse lymphocytaire dilué, du réactif contrôle de lysat dilué, des contrôles positif et négatif dilués, et du réactif PNPP reconstitué et dilué.
- 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.
- Dû à la petite taille des micropuits de faible volume, il est essentiel que le lecteur de microplaques soit vérifié pour un alignement approprié.
- Ne pas utiliser une longueur d'onde de référence lors de la lecture de la plaque par le lecteur de microplaque.

AVERTISSEMENTS

- Tous les sérums d'origine humaine utilisés dans les contrôles négatif et positif 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. Lorsqu'il est 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 doit être nettoyé immédiatement.
- Jeter les réactifs terminés selon les règlements locaux.

ÉCHANTILLONS

Cellules: Il est recommandé de prélever la rate selon les procédures locales d'acquisition. La rate doit être traitée dans les 72 heures suivant le prélèvement. Les lymphocytes provenant du sang périphérique doivent être prélevés dans des tubes avec de l'héparinate de sodium ou ACD selon des techniques aseptiques et doivent être traités dans les 72 heures suivant le prélèvement.

Sérum: Le sang doit être prélevé sans anticoagulant (sérum) selon des techniques aseptiques et doit 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 de sérum 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 dans de bonnes conditions pendant 2 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 lorsqu'il est conservé ou expédié.

Des particules ou des agrégats dans l'échantillon de sérum 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, qui ne contient pas d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines HLA, peut modifier les résultats.

Des échantillons contaminés par des microbes, hémolysés, lipémiques, ictériques ou inactivés par la chaleur peuvent donner des résultats incohérents et doivent 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. 12 – 1 x 8 barrettes de micropuits de faible volume avec support contenant des anticorps monoclonaux immobilisés contre les glycoprotéines HLA de classe I, avec une marque bleue.
2. 12 – 1 x 8 barrettes de micropuits de faible volume avec support contenant des anticorps monoclonaux immobilisés contre les glycoprotéines HLA de classe II, avec une marque mauve.
3. 1 x 125 ml solution de lavage concentrée
4. 1 x 14 ml tampon pour échantillon
5. 1 x 14 ml tampon de substrat
6. 1 x 14 ml solution d'arrêt
7. 1 x 120 µl conjugué anti-IgG humain
8. 1 x 14 ml tampon de lysat et conjugué
9. 1 x 2,5 ml tampon de lyse lymphocytaire
10. 1 x 14 µl réactif contrôle de lysat (classe I)
11. 1 x 14 µl réactif contrôle de lysat (classe II)
12. 1 x culot de contrôle lymphocytes séchés
13. 6 x 50 mg substrat PNPP
14. 1 x 200 µl sérum contrôle positif
15. 1 x 200 µl sérum contrôle négatif
16. 18 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 1-10 µl, 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 nm.
6. Eau déionisée ou distillée
7. Papier absorbant
8. Laveur de microplaques
9. Centrifugeuse
10. Incubateur ou bain-marie à 37°C
11. Milieu de culture cellulaire complet
12. Milieu de séparation lymphocytaire (1,077 g/mL)
13. Glace

Cette procédure se divise en trois parties principales: 'Préparation du lysat du contrôle de lymphocytes séchés', 'Préparation du lysat du Donneur' et 'Procédure du test'. Conseils utiles:

1. Les lysats de contrôle et de donneurs peuvent être préparés à l'avance et des aliquots peuvent être congelés à -70 à -80°C. Si les lysats de contrôle et de donneurs ont été préparés antérieurement, aller à 'Procédure du test'.
2. Un contrôle négatif et un contrôle de lysat doivent être inclus pour chaque lysat de donneur analysé.
3. Le contrôle de réactif (contrôle de sérum positif) doit aussi être inclus dans chaque analyse de classe I et de classe II.
4. Afin de diminuer les effets néfastes des protéases sur les glycoprotéines HLA, les lysats lymphocytaires doivent être conservés sur la glace pour une courte période n'excédant pas 4 heures.
5. Congeler immédiatement ce qui reste du lysat du donneur non dilué ou du contrôle lymphocyte en petit aliquots (usage unique) dans des tubes fermés et notés à -70 à -80°C. Conservation allant jusque 2 ans.
6. Il est crucial de centrifuger à la vitesse recommandée. NE PAS varier la vitesse de centrifugation établie.

Préparation du lysat du contrôle de lymphocytes séchés :

1. Réhydrater le culot de contrôle de lymphocytes séchés
 - a) Réhydrater le contrôle de lymphocytes séchés (**DLC**) en ajoutant 500 µL du milieu de culture cellulaire complet au culot de cellules sèches.
 - b) Laisser reposer à la température ambiante pour au moins 1 heure.
 - c) Déloger le culot de cellules à l'aide d'un embout de pipette et vortexer pour obtenir une suspension cellulaire uniforme.
 - d) Centrifuger le mélange à une vitesse de 1.000 de 1.500 rcf pendant 5 minutes pour culotter les cellules.
 - e) Laisser le surnageant sur les cellules jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être lysées.

2. Lyse du contrôle de lymphocytes séchés

- a) Préparer 0,5 mL de tampon de lyse dilué en ajoutant 50 µL de tampon de lyse à 450 µL d'eau déionisée ou distillée. Conserver le tampon de lyse dilué sur la glace pendant maximum 4 heures.

NOTE: Le tampon de lyse lymphocytaire est visqueux. Amorcer les embouts de pipette en prélevant-distribuant 2-3 fois dans le tampon de lyse lymphocytaire avant de l'ajouter à l'eau déionisée ou distillée et rincer après chaque distribution. Bien mélanger.

- b) Enlever le surnageant du contrôle de lymphocytes séchés réhydraté (**DLC**).
- c) Le Contrôle de Lymphocytes séchés réhydratés (**DLC**) doit être lysé dans 500 µL de Tampon de lyse lymphocytaire. Bien mélanger à l'aide d'un embout de pipette et en vortexant jusqu'à suspension complète des cellules. Centrifuger à 1.000-1.500 rcf pendant 3 – 5 minutes afin de sédimenter les membranes cellulaires. Transférer le surnageant dans un tube propre bien identifié.
- d) Le lysat du contrôle de lymphocytes séchés doit être conservé sur glace jusqu'à son utilisation dans l'essai (ne pas excéder 4 heures). Le lysat du contrôle de lymphocytes séchés doit être conservé congelé à -70 à -80°C en vue d'une utilisation future.

Préparation du lysat du Donneur :

1. Calcul de la quantité de cellules à préparer

- a) Assigner un emplacement pour chaque échantillon de sérum à tester à l'aide du tableau de résultats pour classe I et classe II.
- b) Compléter le premier calcul sur le tableau de calculs de lysats afin de déterminer la quantité de lysat *dilué* nécessaire.
- c) Compléter le deuxième calcul pour déterminer le volume de lysat *non dilué* nécessaire pour les barrettes de classe I.
- d) Compléter le troisième calcul pour déterminer le volume de lysat *non dilué* nécessaire pour les barrettes de classe II.
- e) Pour le quatrième calcul, ajouter le volume du lysat de classe I au volume de classe II lysat pour obtenir le volume total de lysat non dilué nécessaire.
- f) Utiliser le dernier calcul pour déterminer le volume de cellules à préparer.
- g) Noter tous les calculs et dilutions sur le tableau.

2. Séparation des cellules des donneurs

Les lymphocytes peuvent être prélevés du sang entier ou de la rate. Le sang entier ou la rate doivent être traités dans les 72 heures suivant le prélèvement.

Sang entier:

- a) Lors de l'utilisation de sang entier, déposer du milieu de séparation lymphocytaire (1,077 g/mL) et centrifuger à une vitesse de 1.000 à 1.500 rcf pendant 15 à 20 minutes. Prélever la couche de cellules à l'interface du milieu de séparation lymphocytaire (1,077 g/mL). Prendre des précautions pour minimiser le nombre de cellules rouges dans la préparation.
- b) Transférer la suspension dans un tube large et centrifuger à une vitesse de 1.000 à 1.500 rcf pendant 5 à 10 minutes pour culotter les cellules. Enlever le surnageant.
- c) Ajouter un volume de milieu de culture cellulaire complet égal à au moins 5 fois le volume du culot. Re-suspendre délicatement les cellules.
- d) Centrifuger pour culotter les cellules et enlever le surnageant (premier lavage).
- e) Répéter les étapes c) et d) pour un total de 3 lavages.
- f) Après le dernier lavage, laisser le surnageant sur les cellules jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être lysées.

Rate:

- a) Pour préparer les lymphocytes à partir de la rate, faire macérer le tissu pour le réduire en petites particules, mettre en suspension dans le milieu de culture cellulaire complet, milieu de séparation lymphocytaire (1,077 g/mL) et centrifuger à une vitesse de 1.000 à 1.500 rcf pendant 15 à 20 minutes. Prélever la couche de cellules à l'interface du milieu de séparation de lymphocytes (1,077 g/mL).
- b) Transférer la suspension dans un tube large et centrifuger à une vitesse de 1.000 à 1.500 rcf pendant 5 à 10 minutes pour culotter les cellules. Enlever le surnageant.
- c) Ajouter un volume de milieu de culture cellulaire complet égal à au moins 5 fois le volume du culot. Re-suspendre délicatement les cellules.
- d) Centrifuger pour culotter les cellules et enlever le surnageant (premier lavage).

- e) Répéter les étapes c) et d) pour un total de 3 lavages.
- f) Après le dernier lavage, laisser le surnageant sur les cellules jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être lysées.

3. Lyse des cellules du Donneur

- a) Pour chaque 100 µL de lymphocytes à lyser, préparer 1,0 mL de tampon de lyse dilué en ajoutant 100 µL de tampon de lyse à 900 µl d'eau déionisée ou distillée. Conserver le tampon de lyse dilué sur la glace pendant 4 heures maximum.

NOTE: Le tampon de lyse lymphocytaire est visqueux. Amorcer les embouts de pipette en prélevant-distribuant 2-3 fois dans le tampon de lyse lymphocytaire avant de l'ajouter à l'eau déionisée ou distillée et rincer après chaque distribution. Bien mélanger.

- b) Transférer le volume requis des cellules de donneurs dans un tube à essai par une des deux méthodes suivantes:
 - i)
 - Enlever le surnageant du culot des cellules lavées.
 - Le volume cellulaire peut être vérifié en ajoutant un volume égal d'eau à un tube à essai identique et en mesurant le volume de l'eau.
 - Ajouter un volume égal de milieu de culture cellulaire au culot de cellules pour faire une suspension cellulaire de 50%.
 - Bien mélanger et transférer deux fois le volume de cellules nécessaire (calculé à l'étape 1 ci-dessus) dans un tube à essai.
 - Centrifuger la suspension cellulaire à une vitesse de 1.000 à 1.500 rcf pendant 5 to 10 minutes pour obtenir un culot contenant le volume de lymphocytes nécessaire.
 - Enlever le surnageant.
 - c) Pour chaque 10 µL de cellules de donneurs compactes ($\approx 30 \times 10^6$ cellules), ajouter 100 µL de tampon de lyse lymphocytaire dilué. Bien mélanger à l'aide d'un embout de pipette et vortexer pour re-suspendre complètement les cellules. Centrifuger à 1.000-1.500 rcf pendant 3 – 5 minutes pour sédimenter les membranes cellulaires. Transférer le surnageant dans un tube propre bien identifié.
 - ii) Autrement, compter les lymphocytes et (à l'aide du tableau suivant comme guide) transférer le nombre approprié de cellules dans un tube à essai en polypropylène. Centrifuger à une vitesse de 1.000 à 1.500 rcf pendant 5 minutes pour obtenir un culot de lymphocytes. Enlever le surnageant.

Volume de lymphocytes	Nombre estimé de lymphocytes obtenus du sang périphérique	Nombre estimé de lymphocytes obtenus de cellules de la rate
10 µl	30×10^6 cellules	30×10^6 cellules
20 µl	50×10^6 cellules	60×10^6 cellules

Si un lysat congelé est utilisé, décongeler un aliquot juste avant utilisation et diluer adéquatement tel que décrit à l'étape 4 de la partie 'Procédure du test' (voir ci-dessous).

Pour les barrettes de Classe I, 2 µL de lysat non dilué ou 6×10^5 de cellules lysées sont nécessaires par puits.

Pour les barrettes de Classe II, 4 µL de lysat non dilué ou 12×10^5 de cellules lysées sont nécessaires par puits.

Procédure du test

1. Amener tous les réactifs à la température de la pièce (22 – 25 °C).
2. Préparer une solution de lavage de travail en diluant la solution de lavage concentrée (TCW). Ajouter 1 volume de solution de lavage concentrée à 9 volumes d'eau déionisée ou distillée. Bien mélanger.
3. Déterminer le nombre d'échantillons de patients à tester.
4. Diluer une quantité adéquate de lysat de donneur ou du contrôle de lymphocytes séchés dans le tampon de lysat et conjugué (LCD) tel qu'il suit, selon les calculs du tableau:
 - a) Identifier un tube 'lysate de donneur classe I'. Préparer une quantité adéquate de lysat pour les barrettes de classe I en diluant 1 part de lysat avec 7 parts de tampon de lysat et conjugué (LCD).
 - b) Identifier un deuxième tube 'lysate de donneur classe II'. Préparer une quantité adéquate de lysat pour les barrettes de classe II en diluant 1 part de lysat avec 3 parts de tampon de lysat et conjugué (LCD).

c) Identifier un troisième tube 'contrôle de lymphocytes séchés'. Préparer une quantité appropriée de lysat de contrôle de lymphocytes séchés en diluant 1 part de lysat de contrôle de lymphocytes séchés avec 3 parts de tampon de lysat et conjugué (LCD). Il est à noter que la dilution pour le contrôle de lymphocytes séchés est la même pour les barrettes classe I et classe II et que ce contrôle doit être utilisé dans les puits contrôle réactifs (RC) des barrettes classe I et classe II.

5. Retirer les montures des micropuits (MS1 ou MS2) du sachet. Retire le nombres de barrettes MS1 and MS2 requises. Resceller toutes barrettes non utilisées dans le sachet protecteur.

NOTE: Seulement deux montures sont fournies dans le coffret. Ne pas la jeter avant que toutes les barrettes aient été utilisée.

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

6. Ajouter 15 µL de lysat de contrôle de lymphocytes séchés *dilué* aux puits désignés pour le contrôle de réactifs des barrettes de classe I et classe II.

7. Ajouter 15 µL de lysat de donneur *dilué* à chaque puits assigné patient, contrôle négatif et contrôle de lysat à chaque bande classe I (bleue) et classe II (pourpre).

NOTE: Si plusieurs échantillons de patients sont testés en même temps, IDENTIFIER CHAQUE BANDE POUR ÉVITER LES ERREURS.

NOTE: Ne pas ajouter de lysats, d'échantillons ni de réactifs aux puits vierges. Assurez-vous de bien ajouter le lysat de classe I dilué aux barrettes bleues et le lysat de classe II dilué aux barrettes pourpres. L'ajout d'une dilution erronée peut causer une défaillance de l'analyse.

8. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incubé pendant 30 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.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET DES CONTRÔLES

9. Diluer le contrôle sérum positif (PC), le contrôle sérum négatif (NC) et le sérum de patient dans le tampon pour échantillon (SD) comme suit et mélanger bien.

	Volume de tampon pour échantillon (SD)	Volume d'échantillon
PC	60 µl	20 µl
NC	60 µl	20 µl
Échantillon de patient (par lysat de donneur)	60 µl	20 µl

NOTE: Ceci procure suffisamment d'échantillons pour tester deux puits de classe I et deux puits de classe II. Centrifuger le sérum du patient à haute vitesse dans une microcentrifugeuse pendant 5-10 min. Récupérer le surnageant pour utilisation.

10. ÉTAPE DE LAVAGE:

- Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur du tissu-éponge absorbant.
- Ajouter 140 µl de solution de lavage de travail.
- Aspirer ou décanter.
- Répéter les étapes b et c pour un total de 3 lavages.
- Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle.

11. A l'aide du tableau de résultat, ajouter les échantillons de patients dilués et les contrôles de réactifs aux puits désignés comme suit:

- Ajouter 15 µL du contrôle de sérum positif dilué aux puits contrôles de réactifs des deux barrettes contenant le lysat contrôle de lymphocytes séchés.
- Ajouter 15 µL du contrôle de sérum négatif dilué aux puits contrôles négatifs.
- Ajouter 15 µL de tampon de lysat et conjugué (LCD) aux puits contrôles de lysat des barrettes de classe I et de classe II. Ceci les empêchera de sécher pendant la prochaine période d'incubation.

d) Ajouter 15 µL de l'échantillon du sérum de patient dilué aux puits désignés contenant le lysat du donneur des barrettes de classe I et de classe II.

12. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber pendant 30 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.

NOTE: Pendant la période d'incubation, exécuter les deux étapes suivantes:

13. Diluer (1/100) le conjugué (**AG**) dans le tampon de lysat et conjugué (**LCD**). Utiliser un contenant en polypropylène.

Barrettes :	4 - 1x8	24 - 1x8
AG	7 µl	50 µl
LCD	700 µl	5 ml

NOTE: Le conjugué est visqueux. Amorcer les embouts de pipette en prélevant-distribuant 2-3 fois dans le conjugué avant de l'ajouter au tampon de lysat et conjugué et rincer après chaque distribution. Bien mélanger.

14. Diluer les réactifs contrôle de lysats (**LCRI et LCRII**) dans le tampon de lysat et conjugué (**LCD**) comme suit:

LCRI et LCRII	2 µl
LCD	198 µl

Bien mélanger.

NOTE: Une mesure précise des réactifs contrôle de lysats (LCR) est importante pour l'obtention de valeurs de contrôle de lysats acceptables.

15. ÉTAPE DE LAVAGE:

- Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur du tissu-éponge absorbant.
- Ajouter 140 µl de solution de lavage de travail.
- Aspirer ou décanter.
- Répéter les étapes b et c pour un total de 3 lavages.
- Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle.

NOTE: Il est important d'enlever complètement toute la solution de lavage après le dernier lavage.

16. Ajouter 15 µL de réactif contrôle de lysat dilué par puits contrôle de lysat:

- ajouter LCR1 dilué aux barrettes de classe I (bleues)
- ajouter LCR2 dilué aux barrettes de classe II (pourpres).

17. Ajouter 15 µL de conjugué dilué par puits (préparé lors d'une étape précédente ci-dessus) aux puits restants sauf aux puits contrôle de lysats et aux puits vierges.

18. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber pendant 30 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.

NOTE: Pendant la période d'incubation, exécuter les deux étapes suivantes:

19. Dissoudre le substrat PNPP (**PN**) 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.

20. Diluer le PNPP (**PN**) dans le tampon de substrat (**SB**).

Barrettes:	4 - 1x8	24 - 1x8
PN	20 µl	120 µl
SB	2 ml	12 ml

Bien mélanger. Protéger de la lumière jusqu'à utilisation. Se conserve à la température de la pièce (20-25°C) pour une période maximale de 45 min avant utilisation.

21. ÉTAPE DE LAVAGE:

- a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur du tissu-éponge absorbant.
- b) Ajouter 140 µL de solution de lavage de travail.
- c) Aspirer ou décanter.
- d) Répéter les étapes b et c pour un total de 3 lavages.
- e) Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle.

Poursuivre rapidement les trois prochaines étapes.

22. Ajouter 50 µL de la solution de PNPP diluée à chaque puits SAUF ceux désignés VIERGES.

23. Incuber les micropuits dans l'obscurité pendant 30 minutes à la TEMPÉRATURE DE LA PIÈCE (22-25°C).

NOTE: Le temps et la température d'incubation suivant 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.

24. Arrêter la réaction par l'ajout de 50 µl de solution d'arrêt (SS) à chaque puits dans le même ordre que celui utilisé lors de l'ajout du substrat. Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt aux puits vierges.

25. Lire la densité optique de chaque puits à 405 ou 410 nm. Si les résultats ne peuvent être lus immédiatement, laisser les puits dans l'obscurité jusqu'à 30 minutes.

NOTE: Ne pas utiliser de filtre de référence lors de la lecture de la plaque

26. 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.

27. Noter les résultats obtenus dans le tableau de résultats.

CONTROLE QUALITÉ

Le contrôle de qualité de MICROAMS® est incorporé à l'intérieur d'un ensemble de test par l'inclusion de sérums contrôles positifs et négatifs et des réactifs contrôle de lysat. 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 (NC)	Contrôle positif (PC)
Valeur moyenne de la densité optique (OD)	≤ 0,300	≥ 1,000

Les puits 'réactifs contrôle lysat' doivent démontrer une réactivité positive (> 2x la valeur obtenue de la moyenne du contrôle négatif). Une réaction positive dans les puits Contrôle Lysat indique que les glycoprotéines HLA sont capturées dans ces puits. Ce contrôle ne va pas nécessairement identifier un lysat préparé ou dilué incorrectement, ou assuré une réactivité sérologique appropriée de la glycoprotéine.

Dans une étude utilisant 35 rates différentes, les résultats de lysats pour les puits contrôle lysat de classe I avaient un écart de DO entre 1,255 et 3,049 avec une valeur moyenne de 2,124 et ceux pour les puits contrôle lysat de classe II avaient un écart de DO entre 0,766 et 2,366 avec une valeur moyenne de 1,808.

Les valeurs de densité optique des échantillons patient obtenues à partir de tests en duplicat doivent se trouver dans les 20% par rapport à la moyenne des duplicats. Les échantillons pour lesquels les résultats sont en dehors de cette limite doivent être retestés.

NOTE: De mauvaises valeurs de duplicata peuvent être causées par l'omission d'un réactif ou de l'échantillon, l'ajout inégal des réactifs, mélanger accidentellement des réactifs, technique de lavage inadéquate, une température d'incubation inégale, mauvais alignement du lecteur de microplaque, une exposition à la lumière lors de l'incubation finale ou une contamination entre puits. L'absence de résultats de tests en duplicata peut mener à l'approbation de résultats erronés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de tests démontrant une valeur de densité optique (OD) égale ou plus grande que 2X la valeur obtenue pour la moyenne des contrôles négatifs sont considérés comme des résultats positifs.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Des résultats erronés peuvent se produire suite à une contamination bactérienne des matériaux du test, des périodes d'incubation inadéquates, des lavages ou décantages inadéquats des puits, l'exposition du substrat à la lumière, l'omission de réactifs, l'exposition à des températures plus grandes ou plus faibles que celles prescrites, des manques ou excès de lysat 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 des 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.

Cette analyse détecte les anticorps IgG uniquement.

Les caractéristiques réalisées par ce produit ont été établies en utilisant des sérums contenant des anticorps ayant des réactivités connues contre les loci HLA A, B et DR.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Afin d'assurer une réactivité et une spécificité adéquates, chaque lot de MICROAMS[®] HLA Classe I and Classe II est testé avant la mise en vente avec des échantillons connus pour posséder des anticorps HLA spécifiques de donneurs.

Évaluation de la performance

MICROAMS[®] a été testé avec la trousse GTI Antibody Monitoring System (AMS[®]) dans une étude comparative. 100 échantillons ont été évalués avec MICROAMS[®] et AMS[®] pour la réactivité contre HLA classe I. 100 échantillons ont été évalués avec MICROAMS[®] et AMS[®] pour la réactivité contre HLA classe II.

MICROAMS [®] Class I	AMS [®] Class I		Total
	Positif	Négatif	
	Positif	52	
Négatif	0	49	49
Total	52	49	101

Concordance: 100%

Méthode Comparative: GTI Antibody Monitoring System : HLA Classe I et Classe II (AMS[®]1+2)

Classe I	Co-positivité	Co-négativité
Valeur	100%	100%
Intervalle de confiance 95% (inférieur)	93.1%	92.7%
Intervalle de confiance 95% (supérieur)	100%	100%

MICROAMS [®] Class II	AMS [®] Class II		Total
	Positif	Négatif	
	Positif	49	
Négatif	0	52	52
Total	49	52	101

Concordance: 100%

Méthode Comparative: GTI Antibody Monitoring System : HLA Classe I et Classe II (AMS[®]1+2)

Classe II	Co-positivité	Co-négativité
Valeur	100%	100%
Intervalle de confiance 95% (inférieur)	92.7%	93.1%
Intervalle de confiance 95% (supérieur)	100%	100%

Précision

Pour évaluer la précision de MICROAMS[®], des études inter-essais et intra-essais ont été menées. L'évaluation de toutes les données a été faite selon le guide approuvé de NCCLS, EP12-A, portant sur l'évaluation de la performance des tests qualitatifs, intitulé 'User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance'. Les données ont démontré une concordance de 100% dans un même essai (n = 20), 100% de concordance entre essais (n=40), et 100% de concordance de lot à lot (3 lots, n = 24) dans les résultats obtenus.

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.
3. Iwaki Y, Terasaki PI, Iwatsuki S, Starzi T, Berne T, Karp R, Heintz F, Hermes M, Ardman L, Wong H, Volpicelli M. Posttransplant serum analysis in human kidney allografts. Transplant Proc 1981 Mar:13 (1 Pt 1)178-180.
4. Karruppan SS, Ohlman s, Moller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. Transplantation 1992; 54:839.
5. Ettenger RB, Terasaki PI, Ting A, Melezkadeh MH, Pennisi AJ, Ulttenbogaart CH, Fine RN. Role of antibodies to B lymphocytes in renal transplantation. Transplant Proc 1977 Mar:9 (1): 751-753.
6. Scronik JC, LefFox WM, Ciccirelli JC, Brunson ME, Bogaard T, Howard RJ, Ackerman JR, Mendez R, Shires DL Jr, Pfaff WW. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. Transplantation 1997 Jul:54(1):61-64
7. Zachary A, Ratner L, and Leffell M, Low Levels of HLA-specific Antibody: Relevance, Detection, and Treatment. Transplantation Proceedings 2001; 33:469-470.
8. Moore SB, Pleger N, and DeGoey S, Comparison of a Solid Phase Enzyme Linked Immunoassay with Anti-Globulin-Augmented Lymphocytotoxicity. Transplantation 1997; 64 (11): 1617-1620.



MICROAMS[®]

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

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 M-AMS

Révision: 2007-10-22 (F)



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

www.gtidiagnostics.com