

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

Einsatz

MICROAMS® ist ein qualitativer Festphasenzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Spender spezifische HLA Klasse I und Klasse II Antigene.

Zum in-vitro Gebrauch.

Zusammenfassung und Erläuterungen

HLA ist ein major antigenic System zur Bestimmung/Bewertung der Überlebenschancen nach Transplantationen oder nach Thrombozytentransfusionen bei sensibilisierten Individuen.¹ HLA Antikörper werden durch Alloimmunisierung während einer Schwangerschaft, durch Transfusion von Blutprodukten oder durch vorausgegangene Transplantationen erworben. Eine Alloimmunisation führt in ca. 33% aller exponierten Fälle zur Antikörperbildung.² HLA Klasse I und II Moleküle sind polymorphe Membran-Glykoproteine. HLA-Antikörper wirken sich negativ auf eine erfolgreiche Transplantationen aus.³⁻⁶ Ein Post Transplant Monitoring dieser Antikörper ist deshalb sehr wichtig, um potentielle Abstoßungsreaktionen beurteilen zu können.^{7,8}

Testprinzip

HLA Glykoproteine werden von Spenderlymphozyten durch Lyse mit einer nicht-ionschen Detergenz gelöst. Die Lymphozytenlysate werden in Vertiefungen, die mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern, die gegen Klasse I und II Antigene gerichtet sind, pipettiert. Die HLA-Glykoproteine binden an die monoklonalen Antikörper. Ungebundene Glykoproteine werden in einem Wachschriff entfernt. Diese Vertiefungen werden dann mit dem Serum des Empfängers getestet. Spezifische gegen HLA Klasse I und/oder II gerichtete Antikörper in der Patientenprobe binden an die HLA-Glykoproteine. Nach einem Wachschriff, bei dem nicht gebundene Antikörper entfernt werden, wird ein Anti-Human IgG zugefügt und inkubiert. Nach einem weiteren Wachschriff, bei dem das ungebundene Anti-IgG entfernt wird, entwickelt sich nach Zugabe des chromogenen Substrats PNPP eine Farbreaktion, die nach 30 Minuten mit NaOH abgestoppt und photometrisch im ELISA-Reader ausgewertet wird.

Es laufen 3 Kontrollsysteme im Testansatz mit:

Die 1. Kontrolle, die Positiv- bzw. Reagenzienkontrolle, besteht aus den mitgelieferten getrockneten Kontrolllymphozyten und einem Antikörper (positive Serumkontrolle), der mit den HLA Klasse I und II Glykoproteinen auf den Lymphozyten reagiert. Nach Rehydrierung wird aus den getrockneten Lymphozyten ein Lysat hergestellt, das mit dem positiven Serum getestet wird, um die Reaktivität des Lymphozyten Lyse Puffers und anderer Reagenzien zu überprüfen.

Die 2. Kontrolle, die Lysatkontrolle, besteht aus zwei konjugierten monoklonalen HLA Antikörpern. Die Klasse I Lysatkontrolle (LCR1) ist gegen HLA Klasse I Glykoproteine und die Klasse II Lysatkontrolle (LCR2) ist gegen HLA Klasse II Glykoproteine gerichtet. Beide Kontrollen müssen positiv reagieren, um die Bindung von Klasse I und II Glykoproteinen an den monoklonalen Antikörper auf der festen Phase zu bestätigen.

Die dritte Kontrolle ist die negative Kontrolle. Positive Reaktionen liegen in den Vertiefungen vor, deren Extinktionen mehr als das Doppelte des Durchschnitts der negativen Kontrolle aufweisen.

Reagenzien

Maximale Anzahl an Bestimmungen pro Testpackung: 44
Lagern Sie die Reagenzien wie auf den Labels angegeben.

- | | | |
|------------|----|--|
| MS1 | 1. | Mikrowells: die „low volume“ Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA Klasse I und II Antigene. Die Klasse I Streifen sind blau, die Klasse II Streifen sind violett markiert. Gebrauchsfertig. Die Streifen sind in einem wieder verschließbaren Beutel eingeschweißt. |
| MS2 | 2. | |
| TCW | 3. | Waschlösungskonzentrat (10 x konzentriert): eine TRIS- Aminomethan gepufferte Lösung mit Na-Cl ₂ und TWEEN 20. Enthält 1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit deionisiertem Wasser verdünnen. Die verdünnte Waschlösung kann bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur (22-25°C) oder bis zu 7 Tagen bei 2-8°C gelagert werden. |

- | | |
|--------------|---|
| SD | 4. Probenverdünnungspuffer: eine Phosphat gepufferte saline Lösung mit Rinderalbumin und Mausserum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig. |
| SB | 5. Substrat Puffer: enthält Diethanolamin, MgCl ₂ und 0,02% Natrium- Azid. Gebrauchsfertig. Dunkel aufbewahren. |
| SS | 6. Stopplösung: 3 M NaOH, gebrauchsfertig. Mit Vorsicht verwenden. |
| AG | 7. Konjugat (100 x konzentriert): ein mit alkalischer Phosphatase markierter konjugierter gereinigter Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen humane IgG; enthält 0,1% Natrium-Azid. (weisse Verschlusskappe). Vor Gebrauch mit Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer verdünnen. |
| LCD | 8. Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer (blaue Verschlusskappe): TRIS gepufferte saline Lösung mit Na-Cl ₂ und 0,05% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig. |
| LLB | 9. Lymphozyten Lyse Puffer (10 x konzentriert): TRIS gepufferte saline Lösung mit nicht-ionischer Detergenz und 0,5% Natrium-Azid Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnen. |
| LCRI | 10. HLA Klasse I Lysatkontrolle (LCRI mit blauer Verschlusskappe) (100 x konzentriert): enthält einen mit alkalischer Phosphatase markierten konjugierten HLA Klasse I spezifischen IgG-Antikörper von der Maus und 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer verdünnen. |
| LCRII | 11. HLA Klasse II Lysatkontrolle (LCRII mit violetter Verschlusskappe) (100 x konzentriert): enthält einen mit alkalischer Phosphatase markierten konjugierten HLA Klasse II spezifischen IgG-Antikörper von der Maus und 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer verdünnen. |
| DLC | 12. Lymphozytenkontrollpellet: getrocknete Lymphozyten. Vor Gebrauch vorbereiten wie beschrieben. |
| PN | 13. PNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat, kristallin: In deionisiertem Wasser auflösen und vor Gebrauch mit Substrat Puffer verdünnen. Dunkel aufbewahren. |
| PC | 14. Positives Kontrollserum (4 x konzentriert); humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. |
| NC | 15. Negatives Kontrollserum (4 x konzentriert) : humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. |
| PS | 16. Abklebefolien |

Vorsichtsmaßnahmen

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen. Für die Herstellung der Lysate kann jede Charge der GTI Lymphozyten Lyse Puffer verwendet werden.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Verklumpung der Lymphozyten vor dem Lyseschritt kann zu schlechter Lysatpräparation führen und damit zu niedrigen Werten bei der Testung mit den Lysatkontrollreagenzien. Es ist ganz wichtig, die Zellen vorsichtig zu behandeln, um Verklumpungen auszuschließen. Kontamination der Lymphozytenpräparation mit Erythrozyten kann die Menge der HLA-Glykoproteine im Lysat verringern. Sie müssen vor der Herstellung des Zellpellets entfernt werden.
- Höhere als die geforderten Zentrifugationsgeschwindigkeiten können zur vorzeitigen Lyse, zu Verklumpungen und zu Verlusten der Lymphozyten führen.
- Lysate können bei -70 bis -80°C gelagert werden. Aufgetaute Lysate nicht wieder einfrieren.

- Vermeiden Sie jede Kontaminationen des Lysat- und Konjugatverdünnungspuffers, der LCRI+II Reagenzien und des Konjugats. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Serum führt zur Neutralisation des Konjugats und der LCRI + II Reagenzien und damit zum Testausfall.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die Verdünnungen des Konjugats, des Lymphozyten Lyse Puffers, der Lysatkontrollreagenzien, der Kontrollen und des Substrats.
- 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.
- Wegen der geringen Größe der « low volume » Vertiefungen ist die korrekte Kalibration des ELISA-Reader ganz wichtig.
- Messen Sie den Test **ohne** Referenzwellenlänge.

Warnhinweise

- Alle verwendeten humanen Seren für die positiven und negativen Kontrollen werden auf die Abwesenheit von HIV, HCV und HB_S-Ag durch FDA zugelassene Methoden untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt werden und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Einigen Reagenzien ist Natrium-Azid als Konservierungsmittel zugesetzt. **Warnung:** Natrium-Azid reagiert auf Blei- und Kupferverbindungen. Alle Kontaktflächen (z.B. Spülbecken) 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

Zellen: Entnehmen Sie Material aus der Milz gemäß Ihrer Labor internen Verfahren und verwenden Sie es innerhalb von 72 Stunden nach Entnahme.

Die Lymphozyten aus peripherem Blut sollten in Na-Heparin oder ACD unter den üblichen aseptischen Bedingungen entnommen werden, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 72 Stunden verwendet werden.

Serum: 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.

Serumproben, die nicht sofort getestet werden, können bei 2-8°C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung (> 48 Stunden) sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. So können diese Proben bis zu 2 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 nur humanes Serum für den Testansatz. Andere Probenmaterialien aus nicht humanem Serum oder Material, das keine Antikörper gegen HLA-Glykoproteine enthält, beeinflussen das Ergebnis.

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

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 bzw. Materialien.

1. 12 – 1 x 8 „low volume microwell“ Streifen in einem Rahmen. Die Vertiefungen enthalten immobilisierte monoklonale Antikörper gegen HLA Klasse I Antigene. Die Streifen sind blau markiert.

2. 12 – 1 x 8 „low volume microwell“ Streifen in einem Rahmen. Die Vertiefungen enthalten immobilisierte monoklonale Antikörper gegen HLA Klasse II Antigene. Die Streifen sind violett markiert.
3. 1 x 125 ml Waschlösungskonzentrat
4. 1 x 14 ml Probenverdünnungspuffer
5. 1 x 14 ml Substrat Puffer
6. 1 x 14 ml Stopplösung
7. 1 x 120 µl Anti-Human IgG Konjugat
8. 1 x 14 ml Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer
9. 1 x 2,5 ml Lymphozyten Lyse Puffer
10. 1 x 14 µl Lysatkontrolle LCRI (Klasse I)
11. 1 x 14 µl Lysatkontrolle LCRII (Klasse II)
12. 1 x getrocknetes Lymphozytenkontrollpellet
13. 6 x 50 mg PNPP Substrat
14. 1 x 200 µl positives Kontrollserum
15. 1 x 200 µl negatives Kontrollserum
16. 18 Abklebefolien

Zusätzlich benötigte Materialien:

1. Eppendorfgefäße und Reagenzröhrchen
2. Transferpipetten
3. Präzisionspipetten mit verstellbarem Volumen 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl und Pipettenspitzen
4. Stoppuhr
5. ELISA-Plattenreader : Wellenlänge 405 - 410nm
6. Deionisiertes Wasser
7. Papiertücher
8. ELISA-Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. 37°C Inkubator oder Wasserbad
11. Zellkulturmedium
12. Lymphozyten Trennmedium (1.077 g/mL)
13. Eis

Diese Abarbeitung ist in 3 Schritte aufgeteilt: die „Lysatpräparation der getrockneten Lymphozytenkontrolle“, die „Präparation der Spenderlysate“ und die „Testdurchführung“.

Hilfreiche Hinweise:

1. Unverdünnte Spender- und Kontrolllysate können schon vorab hergestellt, aliquotiert und bei -70 bis -80°C eingefroren werden. Gehen Sie bei Verwendung dieser bereits hergestellten Aliquots direkt zur „Testdurchführung“.
2. Führen Sie für jedes Spenderlysate eine negative Kontrolle und eine Lysatkontrolle mit.
3. Die Reagenzien- bzw. positive Serumkontrolle muß bei jedem Klasse I und II Ansatz mitgeführt werden.
4. Um den schädlichen Einfluss der Protease auf die HLA-Glykoproteine zu reduzieren, können die Lymphozytenlysate für kurze Zeit (max. bis zu 4 Stunden) auf Eis gelagert werden.
5. Frieren Sie sofort alle restlichen unverdünnten Spenderlysate und/oder Kontrolllysate in kleinen Aliquots (1 Ansatz/Aliquot) in verschlossene und beschriftete Gefäße bei -70 bis -80°C bis zu 2 Jahren ein.
6. Zentrifugieren Sie nur mit den vorgegebenen rcf. Weichen Sie von den Vorgaben nicht ab.

Lysatpräparation der getrockneten Lymphozytenkontrolle

1. Rehydrierung der getrockneten Lymphozytenkontrolle
 - a) Rehydrieren Sie das getrocknete Lymphozytenkontrollpellet (**DLC**), indem Sie 500µl Zellkulturmedium zum getrockneten Lymphozytenkontrollpellet geben.
 - b) Lassen Sie es bei Raumtemperatur 1 Stunde rehydrieren.
 - c) Brechen Sie mit der Pipettenspitze das Pellet auf und vortexen Sie anschließend, sodass eine Zellsuspension entsteht.
 - d) Zentrifugieren Sie anschließend diese Suspension bei 1.000-1.500 rcf für 5 Minuten, um die Zellen zu pelletieren.
 - e) Lassen Sie den Überstand auf den Zellen bis zur Herstellung der Lysate.

2. Lyse der getrockneten Lymphozytenkontrolle

- a) Bereiten Sie 0,5 ml verdünnten Lyse Puffer vor, indem Sie 50 µl Lymphozyten Lyse Puffer **LLB** mit 450 µl deionisiertem Wasser mischen. Lagern Sie den verdünnten Lyse Puffer bis zur weiteren Verwendung auf Eis bis zu max. 4 Stunden.

Hinweis: Der Lymphozyten Lyse Puffer (LLB) ist sehr viskos. Ziehen Sie vor Zugabe des LLB zum deionisierten Wasser die Pipettenspitze 2-3 mal auf. Gut mischen.

- b) Entfernen Sie nun den Überstand von der rehydrierten Lymphozytenkontrolle (**DLC**).
- c) Die rehydrierte getrocknete Lymphozytenkontrolle (**DLC**) wird in 500 µl des verdünnten Lyse Puffers lysiert. Mit Hilfe einer Pipetenspitze gut mischen und anschließend vortexen, um die Zellen vollständig zu resuspendieren. Zentrifugieren Sie den Mix für 3-5 Minuten bei 1.000-1500 rcf, um die Zellmembranen zu sedimentieren. Überführen Sie den Überstand in ein sauberes beschriftetes Gefäß.
- d) Das Konrolllysat wird bis zu seiner Verwendung auf Eis bis zu max. 4 Stunden gelagert. Es kann bei -70 bis -80°C eingefroren und für spätere Einsätze gelagert werden.

Präparation der Spenderlysate:

1. Berechnung der Menge an benötigten Zellen

- a) Legen Sie die Position der zu testenden Patientenseren auf dem beiliegenden Protokollbogen/Recording Sheet fest.
- b) Berechnen Sie mit Hilfe des beiliegenden Lysate Calculation Worksheet zuerst die benötigte Menge an verdünntem Lysat.
- c) Berechnen Sie danach die Menge an unverdünntem Lysat für die Klasse I Streifen.
- d) Berechnen Sie danach die Menge an unverdünntem Lysat für die Klasse II Streifen.
- e) Addieren Sie die beiden Volumina, um die benötigte Gesamtmenge an unverdünntem Lysat zu ermitteln.
- f) Bestimmen Sie nun das Volumen der benötigten Zellen
- g) Dokumentieren Sie alle Kalkulationen und Verdünnungen auf Ihrem Worksheet.

2. Gewinnung/Isolation der Spenderzellen:

Lymphozyten können sowohl aus Vollblut wie auch aus der Milz gewonnen werden. Die Abarbeitung sollte in beiden Fällen innerhalb von 72 Stunden nach Entnahme durchgeführt werden.

Vollblut:

- a) Isolieren Sie bei der Verwendung von Vollblut die Spenderzellen auf einem geeigneten Trennmedium (1.077 g/mL) und zentrifugieren Sie das Röhrchen bei 1.000-1.500 rcf für 15-20 Minuten. Sammeln Sie die Zellen und vermeiden Sie dabei Erythrozytenkontaminationen!
- b) Überführen Sie die Zellsuspension in ein großes Röhrchen und zentrifugieren Sie es bei 1.000-1.500 rcf 5-10 Minuten, um die Zellen zu pelletieren. Entfernen Sie den Überstand.
- c) Resuspendieren und waschen Sie die Zellen mit Zellkulturmedium, indem Sie das 5fache des Pelletvolumen zupipettieren.
- d) Zentrifugieren Sie die Zellen und werfen Sie den Überstand.
- e) Wiederholen Sie die Punkte c) und d) für insgesamt 3 Waschvorgänge.
- f) Lassen Sie den Überstand nach dem letzten Waschschritt auf den Zellen bis zur Vorbereitung der Lysate.

Milz:

- a) Zerteilen Sie zur Vorbereitung von Lymphozyten aus der Milz das Gewebe in kleine Teile und suspendieren Sie das Gewebe in Zellkulturmedium, beschichten Sie die Zellen mit Trennmedium (1.077 g/mL) und zentrifugieren Sie das Röhrchen bei 1.000-1.500 rcf für 15-20 Minuten, um den Zelllayer zu isolieren.
- b) Überführen Sie die Zellsuspension in ein großes Röhrchen und zentrifugieren Sie es bei 1.000-1.500 rcf 5-10 Minuten, um die Zellen zu pelletieren. Entfernen Sie den Überstand.
- c) Resuspendieren und waschen Sie die Zellen mit Zellkulturmedium, indem Sie das 5fache des Pelletvolumen zupipettieren.
- d) Zentrifugieren Sie die Zellen und werfen Sie den Überstand.
- e) Wiederholen Sie die Punkte c) und d) für insgesamt 3 Waschvorgänge.
- f) Lassen Sie den Überstand nach dem letzten Waschschritt auf den Zellen bis zur Vorbereitung der Lysate.

3. Lyse der Spenderzellen

- a) Bereiten Sie für je 100 µl zu lysierendes Lymphozytenpellet 1,0 ml verdünnten Lyse Puffer vor, indem Sie zu 900 µl deionisiertem Wasser 100 µl Lymphozyten Lyse Puffer (LLB) pipettieren und gut mischen. Lagern Sie den verdünnten Lyse Puffer bis zur weiteren Verwendung auf Eis bis zu max. 4 Stunden.

Hinweis: Der Lymphozyten Lyse Puffer (LLB) ist sehr viskos. Ziehen Sie vor Zugabe des LLB zum deionisierten Wasser die Pipettenspitze 2-3 mal auf. Gut mischen.

- b) Überführen Sie die benötigte Menge an Spenderzellen in ein Eppendorfgefäß, indem Sie nach einer der zwei folgenden Methoden verfahren:
- i) • Entfernen Sie den Überstand vom Pellet der gewaschenen Zellen.
• Überprüfen Sie das Volumen des Zellpellets, indem Sie in ein identisches Gefäß Wasser in der gleichen Menge wie das Zellpellet pipettieren und das Volumen des Wassers messen.
• Geben Sie das gleiche Volumen Zellkulturmedium zum Pellet zur Herstellung einer 50% Zellsuspension.
• Mit der Pipette gut mischen. Überführen Sie anschließend das Doppelte der benötigten bzw. unter Punkt 1. berechneten Menge in ein Eppendorfgefäß.
• Zentrifugieren Sie diese Zellsuspension 5-10 Minuten bei 1.000- 1.500 rcf, um ein Pellet mit den benötigten Zellen zu erhalten.
• Entfernen sie den Überstand.
- c) Geben Sie zu je 10 µl Spenderzellpellet ($\approx 30 \times 10^6$ Zellen) 100 µl des vorbereiteten verdünnten Lymphozyten Lyse Puffer. Mit Hilfe einer Pipettenspitze gut mischen und anschließend vortexen, um die Zellen vollständig zu resuspendieren. Zentrifugieren Sie den Mix für 3-5 Minuten bei 1.000-1.500 rcf, damit die Zellmembranen sedimentieren. Überführen Sie den Überstand in ein sauberes, beschriftetes Gefäß.
- ii) Alternativ können Sie die Zellen auch zählen (die folgende Tabelle dient Ihnen hier als Hilfe) und die benötigte Menge an Zellen in ein Polypropylenröhrchen überführen und 5 Minuten bei 1.000-1.500 rcf zentrifugieren, um die Zellen zu pelletieren. Entfernen Sie den Überstand.

Volumen pelletierter Lymphozyten	Erwartete Anzahl von Lymphozyten aus peripherem Blut	Erwartete Anzahl von Lymphozyten aus der Milz
10 µl	30×10^6 Zellen	30×10^6 Zellen
20 µl	50×10^6 Zellen	60×10^6 Zellen

Tauen Sie bei der Verwendung der eingefrorenen, unverdünnten Lysate die Aliquots erst kurz vor ihrer Verwendung auf und verdünnen Sie sie wie unter Punkt 4 der folgenden Testdurchführung beschrieben.

Für die HLA Klasse I Streifen benötigen Sie 2 µl unverdünntes Lysat oder 6×10^5 lysierte Zellen pro Vertiefung.

Für die HLA Klasse II Streifen benötigen Sie 4 µl unverdünntes Lysat oder 12×10^5 lysierte Zellen pro Vertiefung.

Testdurchführung

1. Alle Reagenzien müssen vor Testdurchführung auf Raumtemperatur (22-25°C) gebracht werden.
2. Waschlösungskonzentrat (TCW) 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnen und mischen.
3. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Patientenproben fest.
4. Stellen Sie nun die benötigten Mengen an verdünnten Spender- und Kontrolllysaten entsprechend Ihrer Berechnung auf dem „Lysate Calculation Worksheet“ her, indem Sie die auf Eis gelagerten Spender- und Kontrolllysate mit dem Lysat- und Konjugatprobenverdünnungspuffer (LCD) wie folgt verdünnen:
 - a) Beschriften Sie ein Röhrchen mit „Spender Klasse I Lysat“. Stellen Sie die benötigte Menge an Lysat für die HLA Klasse I Streifen her, indem Sie die Lysate 1:8 mit dem LCD verdünnen.
 - b) Beschriften Sie ein 2. Röhrchen mit „Spender Klasse II Lysat“. Stellen Sie die benötigte Menge an Lysat für die HLA Klasse II Streifen her, indem Sie die Lysate 1:4 mit dem LCD verdünnen.

c) Beschriften Sie ein 3. Röhrchen mit „Lymphozytenkontrolle“. Stellen Sie die benötigte Menge an Kontrolllysat her, indem Sie die Lyrate 1:4 mit dem **LCD** verdünnen. Bitte beachten Sie, dass die Verdünnung der Lymphozytenkontrolle für alle Streifen der beiden HLA-Klassen identisch ist und dass diese Kontrolle in den Vertiefungen der Reagenzkontrolle beider Streifen (Klasse I und II) angesetzt wird.

5. Die für den Test benötigte Anzahl an Streifen unmittelbar vor der Testdurchführung aus den wieder verschließbaren Beuteln (MS1 und/oder MS2) entnehmen und in den Rahmen einsetzen. Legen sie die nicht verwendeten Streifen wieder in den Beutel zurück und verschließen Sie ihn.

Hinweis: Es werden nur 2 Rahmen mitgeliefert. Heben Sie deshalb die Rahmen bis zur letzten Austestungen auf.

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.

6. Pipettieren Sie 15µl des verdünnten Lymphozyten-Kontrolllysat in die Vertiefungen für die Reagenzienkontrolle der Streifen beider HLA Klassen.

7. Pipettieren Sie 15 µl der verdünnten HLA-Klasse I und II Spenderlysat in alle Vertiefungen, die mit Patient, negative Kontrolle und LySATkontrolle ausgewiesen sind auf dem Klasse I und Klasse II Streifen.

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

Hinweis: Die Blanksvertiefungen bleiben leer. Beachten Sie die richtige Zuordnung der verdünnten Klasse I und II LySAT zu den farblich kodierten HLA Klasse I und II Streifen: Klasse I ist blau und Klasse II ist violett markiert. Verwechslungen führen zum Testausfall.

8. Versiegeln Sie die Streifen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie 30-Minuten bei 37°C im Wasserbad oder 40 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

Vorbereitung der Proben und Kontrollen

9. Verdünnen Sie die Patientenseren und die beiden Kontrollen (**PC+NC**) in Probenverdünnungspuffer (**SD**). Gut mischen.

	Menge des Probenverdünnungspuffer (SD)	Menge der Probe bzw. der Kontrollen
PC	60 µL	20 µL
NC (pro Spenderlysat)	60 µL	20 µL
Patientenprobe (pro Spenderlysat)	60 µL	20 µL

Hinweis: Die Probenverdünnung reicht zum Ansatz von zwei Klasse I und zwei Klasse II Vertiefungen. Zentrifugieren Sie die Patientenseren für 5-10 Minuten bei hoher Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge. Nehmen Sie den Überstand für den Ansatz.

10. Waschschritte:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie die den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 140 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen noch 2 x wie unter b) und c) beschrieben.
- e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie die den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um **alle** Flüssigkeitsreste zu entfernen.

11. Verteilen Sie die verdünnten Patientenseren und Kontrollen entsprechend Ihres Recording Sheet/Protokollbogens:

- a) Pipettieren Sie 15 µl der verdünnten positiven Serumkontrolle in die Vertiefungen der Positiv- bzw. Reagenzienkontrolle des jeweils 1. Streifens der entsprechenden HLA-Klasse.
- b) Pipettieren Sie 15 µl der verdünnten negativen Kontrolle in die entsprechenden Vertiefungen für die negative Kontrolle.
- c) Pipettieren Sie 15 µl LySAT- und Konjugatprobenverdünnungspuffer in die Vertiefungen der LySATkontrolle in den Streifen beider HLA-Klassen. So werden die Kontrollvertiefungen vor Austrocknung bei der nächsten Inkubation geschützt.

d) Pipettieren Sie 15 µl der verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen mit dem verdünnten Spenderlysat.

12. Versiegeln Sie die Streifen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder 40 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

Hinweis: Führen Sie während dieser Inkubation die folgenden 2 Schritte durch:

13. Verdünnen Sie das Konjugat (**AG**) 1:101 im Lysat und Konjugatverdünnungspuffer (**LCD**) in einem Polypropylenröhrchen.

Streifenanzahl	4 – 1x8	24 – 1x8
AG	7 µL	50 µL
LCD	700 µL	5 mL

Hinweis: Das Konjugat ist sehr viskos. Ziehen Sie es deshalb vor Zugabe in **LCD** vorsichtig 2-3 mal auf und mischen Sie es im Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer gut durch.

14. Verdünnen Sie die Lysatkontrollreagenzien (**LCR1 und LCR2**) mit dem Lysat- und Konjugatverdünnungspuffer (**LCD**) wie folgt und mischen Sie gut durch:

LCR I oder LCR II	2 µl
LCD	198 µl

Gut mischen!

Hinweis: Die Volumina der LCR-Reagenzien müssen exakt eingehalten werden, um korrekte Lysatkontrollwerte zu erreichen.

15. Waschschritte:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 140 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen noch 2 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 Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

16. Geben Sie je 15 µl der beiden verdünnten Lysatkontrollen in die entsprechenden Vertiefungen:

- geben Sie LCR I nur in den blau markierten HLA Klasse I Streifen und
- geben Sie LCR II nur in den violett markierten HLA Klasse II Streifen.

17. Pipettieren Sie 15 µl des verdünnten Konjugats aus Punkt 13. in alle übrigen Vertiefungen mit Ausnahme der Lysatkontrollen und Blanks (siehe Protokollbogen).

18. Versiegeln Sie die Streifen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder 40 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

Hinweis: Arbeiten Sie während dieser Inkubation die zwei nächsten Schritte ab:

19. Lösen Sie das kristalline PNPP Substrat (**PN**) auf, indem Sie 500 µl deionisiertes Wasser in das Fläschchen pipettieren. Setzen Sie den Verschluss wieder ein und mischen Sie gut. Schützen Sie das Substrat bis zur weiteren Verwendung vor Licht.

20. Verdünnen Sie das PNPP (**PN**) in Substrat Puffer (**SB**) wie folgt:

Streifenanzahl:	4 - 1x8	24 - 1x8
PN	20 µL	120 µL
SB	2 mL	12 mL

Gut mischen und bis zum Gebrauch dunkel aufbewahren. Verwendung bei Lagerung bei Raumtemperatur (22-25°C) innerhalb von 45 Minuten.

21. Waschschritte:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 140 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen 2 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.

22. 50 µl PNPP **sofort** in alle Vertiefungen pipettieren mit Ausnahme der Blank- Vertiefungen!

23. 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.

24. 50 µl Stopplösung (SS) in **alle** Vertiefungen pipettieren. Füllen Sie die Blanks auf je 100 µl Stopplösung auf.

25. Die Reaktionen werden nach dem Stoppen im ELISA-Reader bei 405 oder 410nm gelesen. Lassen Sie die Streifen im Dunkeln bis zu max. 30 Minuten stehen, wenn die Ablesung nicht sofort nach dem Abstoppen gemacht werden kann.

Hinweis: Benutzen Sie keine Referenzwellenlänge für die Ablesung der Streifen im ELISA-Reader.

26. Ziehen Sie die Blank-OD Werte von den OD-Werten der Proben und Kontrollen ab. Bei vielen ELISA-Readern läßt sich dieses programmieren.

27. Übertragen Sie Ihre Werte auf den Protokollbogen (RS).

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle des **MICROAMS®** besteht aus 3 Kontrollen. Sie müssen bei jedem Testansatz mitgeführt werden, um technische Fehler oder Reagenzienfehler auszuschließen.

Kriterien für einen validen Test:

	Negative Kontrolle (NC)	Reagenzien Kontrolle (PC)
OD Mittelwert	≤ 0.300	≥ 1.000

Die OD-Werte in den Vertiefungen der Lysatkontrolle müssen eine positive Reaktion vorweisen (>2x des Durchschnittswerts der negativen Kontrolle).

Eine positive Reaktion in diesen Vertiefungen bestätigt, dass HLA-Glykoproteine in diesen Vertiefungen gecaptured wurden. Diese Kontrolle identifiziert oder bestätigt nicht ein ungenau ausgeführtes Lysat oder dessen Verdünnung oder bestätigt auch nicht ein unzureichende serologische Reaktivität des Glykoproteins.

In einer Studie mit 35 verschiedenen Milzlysaten lagen die OD-Werte für HLA Klasse I Lysatkontrollen im Bereich von 1.255 – 3.049 bei einem Durchschnitt von 2.124. Die OD-Werte für die HLA-Klasse II lagen zwischen 0.766 und 2.366 und einem Durchschnitt von 1.808.

Die Extinktionen der Doppelbestimmungen positiver Patientenwerte sollten nicht mehr als 20% von ihrem Durchschnitt abweichen. Proben außerhalb dieses Bereichs sollten wiederholt werden.

Hinweis: Schlechte Doppelbestimmungen können aus dem Auslassen von Reagenzien oder Proben bis hin zur Nichtzugabe von Reagenzien oder falsche Reagenzmischungen resultieren. Schlechtes Waschen, falsche Inkubationszeiten und –temperaturen, nicht kalibrierte ELISA-Reader oder Streulicht während der Substratinkubation oder Kreuzkontaminanten sind Ursachen für schlechte Doppelbestimmungen. Nur der Ansatz in Doppelbestimmung verhindert das Übersehen von falschen Ergebnissen.

Auswertung

Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion des Mittelwertes der Probe mindestens doppelt so hoch ist wie der Mittelwert der negativen Kontrolle.

Einschränkungen

Bakterielle Kontaminationen der Reagenzien, falsche Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, unzureichendes Waschen und Ausklopfen der Vertiefungen, falsche Volumina, Streulicht bei der Substratinkubation, schlechte Lyse 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.
Der Test weist nur IgG Antikörper nach.

Die Leistungen dieses Test werden mit bekannten Seren, die Antikörper gegen HLA A, B und DR enthalten, bestätigt.

Evaluation der Leistungen

Um die Reaktivität und Spezifität des **MICROAMS[®]** zu garantieren, wird jede Charge mit bekannten Seren, die Spender spezifische HLA Antikörper enthalten, überprüft.

Evaluation der Durchführung

MICROAMS[®] wurde mit dem GTI Antibody Monitoring System (AMS[®]) Testkit methodisch verglichen. 100 Proben wurden evaluiert mit MICROAMS[®] und AMS[®] zur Bestimmung der Reaktivität der HLA Klasse I und Klasse II.

		AMS [®] Klasse I		Gesamt
		Positiv	Negativ	
MICROAMS [®] Klasse I	Positiv	52	0	52
	Negativ	0	49	49
	Gesamt	52	49	101

Übereinstimmung: 100%
Vergleichende Methode: GTI Antibody Monitoring System: HLA Klasse I und Klasse II (AMS[®] 1+2)

Klasse I	Co-Positivität/Sensitivität	Co-Negativität/Spezifität
Value	100%	100%
95% confidence level (lower)	93.1%	92.7%
95% confidence level (upper)	100%	100%

		AMS [®] Klasse II		Gesamt
		Positiv	Negativ	
MICROAMS [®] Klasse II	Positiv	49	0	49
	Negativ	0	52	52
	Gesamt	49	52	101

Übereinstimmung: 100%
Vergleichende Methode: GTI Antibody Monitoring System: HLA Klasse I und Klasse II (AMS[®] 1+2)

Klasse II	Co-Positivität/Sensitivität	Co-Negativität/Spezifität
Value	100%	100%
95% confidence level (lower)	92.7%	93.1%
95% confidence level (upper)	100%	100%

Präzision

Zur Evaluierung der MICROAMS® Präzision wurden inter- und intra-Assay Studien nach dem NCCLS User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline EP12-A durchgeführt. In beiden Fällen wurden zwei bekannte positive und zwei bekannte negative Proben mit zwei verschiedenen Lysaten getestet.

Die Daten belegen eine 100% Übereinstimmung within runs (n=20), between runs (n=40) und für lot-to-lot (3 lots, n=24) bei den erzielten Ergebnissen.

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.
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, Melekzadeh 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, Cicciarelli 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.



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

MICROAMS®
Micro-Antibody Monitoring System

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



REF

M-AMS

Rev. 2007-10-22 (G)

EC REF

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

www.gtidiagnostics.com