

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

ΕΝΔΕΛΞΙΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η MICROAMS® είναι μια ποιοτική, στερεάς φάσης ενζυματική ανοσοδεσμευτική μέθοδος ανάλυσης (ELISA) για την ανίχνευση IgG αντισώματα έναντι αντιγόνων ειδικών HLA τάξης I και II.

Για *Εργαστηριακή Διαγνωστική Χρήση*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Το HLA είναι ένα μείζον σύστημα για τον προσδιορισμό των επιζώντων αλλομοσχευμάτων ή μεταγγισθέντων αιμοπεταλίων σε ευαίσθητοποιημένα άτομα.¹ Τα αντισώματα HLA μπορεί να αποκτηθούν μέσω αλλοανοσοποίησης ως αποτέλεσμα κύησης, μετάγγισης προϊόντων αίματος, ή προηγούμενων μοσχευμάτων. Εν γένει, η αλλοανοσοποίηση οδηγεί σε παραγωγή αντισωμάτων HLA σε ποσοστό περίπου 33% των εκτεθειμένων ατόμων.² Τα μόρια της Τάξης I και Τάξης II του HLA είναι γλυκοπρωτεΐνες πολυμορφικής μεμβράνης. Τα αντισώματα κατά αντιγόνων HLA αντενδείκνυνται στην επιτυχία των μεταμοσχεύσεων.³⁻⁶ Η παρακολούθηση, αυτών των αντισωμάτων μετά την μεταμόσχευση, είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας του μοσχεύματος.^{7,8}

ΑΡΧΗ

Οι γλυκοπρωτεΐνες HLA παρασκευάζονται από λεμφοκύτταρα διαλυτοποιώντας τα κύτταρα με ένα μη-ιοντικό απορρυπαντικό. Μόλις διαλυτοποιηθούν, προστίθεται κυτταρόλυμα λεμφοκυττάρων στα μικροβυθίσματα, στα οποία έχουν ακινητοποιηθεί μονοκλωνικά αντισώματα, ειδικά ως προς τις τάξεις I και II του HLA. Οι γλυκοπρωτεΐνες HLA αφήνονται να δεσμευθούν στα μονοκλωνικά αντισώματα, και όσες δεν δεσμεύονται, εκπλένονται. Τα μικροβυθίσματα που περιέχουν τις δεσμευμένες γλυκοπρωτεΐνες, εξετάζονται με ανθρώπινο ορό για να ανιχνευθούν αντισώματα κατά των μορίων HLA. Στη συνέχεια, τα μη δεσμευμένα αντισώματα εκπλένονται. Στα μικροβυθίσματα προστίθεται μια αλκαλική φωσφατάση, σημασμένη ως αντδραστήριο αντιανθρώπινης αιμοσφαιρίνης (Anti-IgG) και επωάζεται. Η μη δεσμευμένη (Anti-IgG) εκπλένεται και προστίθεται υπόστρωμα PNPP (π- φωσφορικό νιτροφαινόλιο). Μετά από επώαση 30 λεπτών, η αντίδραση διακόπτεται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Η οπτική πυκνότητα της χρώσης που αναπτύσσεται, μετράται σε φασματοφωτόμετρο.

Αυτό το διαγνωστικό σύνολο αποτελείται από τρία συστήματα ελέγχου:

Το πρώτο σύστημα αποτελείται από ένα αφυγρασμένο λεμφοκύτταρο (Ορός Ελέγχου Αφυγρασμένου Λεμφοκυττάρου) και ένα αντίσωμα (Θετικός Ορός Ελέγχου) τα οποία αντιδρούν με γλυκοπρωτεΐνες της Τάξης I και Τάξης II στο λεμφοκύτταρο. Το αφυγρασμένο λεμφοκύτταρο επανενυδατώνεται και διαλυτοποιείται για την παρασκευή κυτταρολύματος. Το κυτταρόλυμα εφαρμόζεται στα βυθίσματα του ορού ελέγχου του αντιδραστήριου. Ο Θετικός Ορός Ελέγχου εξετάζεται έναντι του ορού ελέγχου του κυτταρολύματος για να διαπιστωθεί ότι το Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης των Λεμφοκυττάρων και τα άλλα αντιδραστήρια ανάλυσης δουλεύουν κανονικά.

Το δεύτερο σύστημα ελέγχου αποτελείται από δύο συζευγμένα μονοκλωνικά αντίσωμα αλκαλικής φωσφατάσης. Το ένα (Το αντιδραστήριο του ορού ελέγχου της Τάξης I του κυτταρολύματος) κατευθύνεται κατά της Τάξης I της HLA γλυκοπρωτεΐνης. Το άλλο, (Το αντιδραστήριο του ορού ελέγχου της Τάξης II του κυτταρολύματος) κατευθύνεται κατά της Τάξης II της HLA γλυκοπρωτεΐνης. Αυτά τα αντιδραστήρια, όταν εξετάζονται απ' ευθείας κατά των δεσμευμένων, στα βυθίσματα, γλυκοπρωτεϊνών, δίνουν θετικά αποτελέσματα, δείχνοντας ότι τα μόρια της Τάξης I ή της Τάξης II HLA, έχουν δεσμευτεί στα βυθίσματα.

Το τρίτο σύστημα ελέγχου είναι ο αρνητικός ορός. Θετικές αντιδράσεις υπάρχουν όταν τα δοκιμαστικά βυθίσματα είναι υψηλότερα από δυο φορές (2x) τον μέσο όρο του αρνητικού ορού ελέγχου.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Ανώτατος αριθμός αναλύσεων ανά διαγνωστικό σύνολο: 44

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται όπως αναγράφεται στην ετικέτα.

MS1	1.	Μικροβυθίσματα : μικρού όγκου, επίπεδο πυθμένα, ταινίες μικροβυθισμάτων στις οποίες έχουν στερεωθεί Μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά ως προς την Τάξη I HLA (χρώματος μπλε) και ως προς την Τάξη II HLA (χρώματος μωβ).
MS2	2.	

- | | |
|--------------|--|
| TCW | 3. Συμπυκνωμένο (10x) Πλυστικό: Αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα τρι (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο περιέχον χλωριούχο νάτριο και Tween 20. 1% νατραζίδιο. Αραιώστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό προ χρήσης. Αποθηκεύσατε το Πλυστικό Διάλυμα έως 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή έως και επτά μέρες σε θερμοκρασία 2-8°C. |
| SD | 4. Διαλύτης Δείγματος: Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών περιέχον Βόιο αλβουμίνη και ορό μύος. 0.1% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση. |
| SB | 5. Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος: Αυτό το διάλυμα περιέχει διαιθανολαμίνη και χλωριούχο μαγνήσιο.0.02% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψατε από το Φως. |
| SS | 6. Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης: 3M Υδροξείδιο του Νατρίου. Έτοιμο προς χρήση. Χρησιμοποιείστε με προσοχή. |
| AG | 7. Σύζευγμα: Σύζευγμα Αλκαλικής (100x) φωσφατάσης αιγός με αντι-ανθρώπινο αντίσωμα αιμοσφαιρίνης υψηλώς κεκαθαρωμένο G, (IgG).0.1%Νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης. (Χρωματικά κωδικοποιημένο Λευκό καπάκι) |
| LCD | 8. Κυτταρόλυμα και Διαλύτης Συζεύγματος: Ρυθμιστικό διάλυμα Tris περιέχον χλωριούχο νάτριο. 0.1% νατραζίδιο. (καπάκι χρώματος μπλε). Έτοιμο προς χρήση. |
| LLB | 9. Ρυθμιστικό Διάλυμα Κυτταρολύματος: Ρυθμιστικό (10x) διάλυμα Tris φυσιολογικού ορού, περιέχον μη-ιοντικό απορρυπαντικό. Απαιτείται αραίωση με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό, προ χρήσης. |
| LCRI | 10. Αντιδραστήριο Ορού Ελέγχου Κυτταρολύματος Τάξης I (LCRI) (100x): Σύζευγμα Αλκαλικής Φωσφατάσης με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την γλυκοπρωτεΐνη HLA Τάξης I. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε σε Κυτταρόλυμα και Διαλύτη Συζεύγματος προ χρήσης. (καπάκι χρώματος μπλε) Προσθέστε σε “αντι-ανθρώπινη G ανοσοσφαιρίνη μύος (IgG).” |
| LCRII | 11. Αντιδραστήριο Ορού Ελέγχου Κυτταρολύματος Τάξης II (LCRII) (100x): Σύζευγμα Αλκαλικής Φωσφατάσης με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την γλυκοπρωτεΐνη HLA Τάξης II. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε σε Κυτταρόλυμα και Διαλύτη Συζεύγματος προ χρήσης. (καπάκι χρώματος μωβ) Προσθέστε σε “αντι-ανθρώπινη G ανοσοσφαιρίνη μύος (IgG).” |
| DLC | 12. Αφυγρασμένοι Ορός Ελέγχου Κυτταρολύματος.Αφυδατωμένα Λεμφοκύτταρα. Προετοιμάστε όπως προτείνεται. |
| PN | 13. Υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση): Κρυσταλλική σκόνη. Ανασυστήστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό και αραιώστε στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος προ χρήσης. Προστατέψατε από το Φως. |
| PC | 14. Θετικός ορός Ελέγχου (4x). Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης. |
| NC | 15. Αρνητικός ορός Ελέγχου (4x). Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δείγματος προ χρήσης. |
| PS | 16. Μεμβράνες κάλυψης πλακών. |

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Μην χρησιμοποιείτε μολυσμένα ή θολά αντιδραστήρια.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια πέραν της αναγραφόμενης ημ/ίας λήξης.
- Υποκατάσταση των συστατικών με άλλα, από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα. Ωστόσο οποιαδήποτε παρτίδα του LLB (Ρυθμιστικού Διαλύματος Κυτταρολύματος) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παρασκευή κυτταρολυμάτων.

- Τα περιεχόμενα στο διαγνωστικό σύνολο, μικροβυθίσματα και αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με άλλο σύστημα ανάλυσης.
- Κατά τις αραιώσεις, ακολουθείστε τις οδηγίες του κατασκευαστή των διανεμητών για τις τεχνικές διανομής και έκπλυσης.
- Για την προσθήκη αντιδραστηρίων πρέπει να χρησιμοποιούνται σωστά καλιμπραρισμένες πιπέτες .
- Το συσσωμάτωμα των λεμφοκυττάρων ή των σπληνοκυττάρων (*αφαιρέστε τα σπληνοκύτταρα*) πριν την λύση μπορεί να παράξει αδύναμα προϊόντα κυτταρόλυσης και ως εκ τούτου, χαμηλές τιμές κατά την εξέταση με το Αντιδραστήριο του Ορού Ελέγχου του Κυτταρολύματος. Είναι σημαντικό, να αποφευχθεί το συσσωμάτωμα των κυττάρων, με προσεκτικό χειρισμό. Η μόλυνση ενός παρασκευάσματος ερυθροκυττάρων , μπορεί να μειώσει την ποσότητα των HLA γλυκοπρωτεϊνών στο κυτταρόλυμα, αν δεν αφαιρεθούν, πριν από τον υπολογισμό του όγκου των συμπιεσμένων κυττάρων.
- Η φυγοκέντριση σε μεγαλύτερες ταχύτητες από τις συνιστώμενες, ενδεχομένως να προκαλέσει πρόωμη λύση του κυτταρολύματος, πήξη, και απώλεια λεμφοκυττάρων.
- Τα κυτταρολύματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -70 έως -80°C προ της χρήσης. Δεν πρέπει να επαναψύχονται.
- ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ προσοχή προς αποφυγήν μόλυνσης, του Διαλύτη Δείγματος και του Συζεύγματος, LCR I και LCR II, και του Συζεύγματος. Η εξ' αμελείας μόλυνση αυτών των αντιδραστηρίων με ανθρώπινο ορό θα έχει ως αποτέλεσμα την ουδετεροποίηση του Συζεύγματος ή των LCR I και LCR II αντιδραστηρίων, και ως εκ τούτου, την αποτυχία της ανάλυσης.
- Απορρίψατε όποιες ποσότητες αραιωμένου Συζεύγματος, αραιωμένου Ρυθμιστικού Διαλύματος Κυτταρολύματος, αραιωμένου Θετικού και Αρνητικού Ορού Ελέγχου, και αραιωμένου ή ανασυσταμένου αντιδραστηρίου PNPP μετά από κάθε προσδιορισμό.
- Η κατά την τελευταία επώαση, αντίδραση ενζυματικού υποστρώματος, είναι ευαίσθητη στην θερμοκρασία και πρέπει να διενεργείται σε ελεγχόμενη περιοχή, σε θερμοκρασία 22-25°C.
- Εξ' αιτίας μεταβολών στα όργανα ή υψηλότερων ή χαμηλότερων θερμοκρασιών δωματίου, συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώνει συγκεκριμένο χρόνο επώασης, ελάχιστα μεγαλύτερο ή μικρότερο, προκειμένου να έχει συνεπή και αξιόπιστα αποτελέσματα των ορών ελέγχου. Επειδή η θερμοκρασία της τελευταίας επώασης ενδέχεται να επηρεάσει τις τιμές των ορών ελέγχου, είναι σημαντικό να ελέγχεται περιοδικά η, σε θερμοκρασία δωματίου, διαδικασία της επώασης.
- Εξ' αιτίας του μικρού μεγέθους των μικροβυθισμάτων μικρού όγκου, είναι σημαντικό να ελέγχονται από τεχνικό οι συντεταγμένες ανάγνωσης του φωτόμετρου.
- Μην χρησιμοποιείτε φίλτρο αναφοράς όταν φωτομετρείτε.

ΠΡΟΣΟΧΗ

- Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι στους Θετικούς και Αρνητικούς Ορούς Ελέγχου για αυτό το προϊόν ανθρώπινοι οροί, έχουν εξεταστεί και βρεθεί αρνητικοί για αντισώματα κατά HIV, HCV και HbsAg από τις εγκεκριμένες μεθόδους του FDA. Ωστόσο, καμία μέθοδος ελέγχου δεν μπορεί να εγγυηθεί απόλυτα την απουσία του ιού HIV, Ηπατίτιδας C, Ηπατίτιδας B, ή άλλων μολυσματικών παραγόντων. Ως εκ τούτου ο χειρισμός αυτών των υλικών συνιστάται να είναι τέτοιος ως εάν να επρόκειτο για εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.
- Κάποια από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο αντιδραστήρια περιέχουν νατραζίδιο ως συντηρητικό. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Το νατραζίδιο αντιδρά με τον χαλκό και τον μόλυβδο των υδραυλικών σωληνώσεων και σχηματίζει εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Όταν απορρίπτετε το αντιδραστήριο, περιχύστε το με άφθονο νερό ούτως ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αζιδίων. Το νατραζίδιο είναι δηλητήριο και τοξικό αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή απορροφηθεί από τις βλεννογόνους μεμβράνες.
- Το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (NaOH) είναι διαβρωτικό. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Τυχούσα πτώση του διαλύματος πρέπει να καθαρίζεται αμέσως.
- Απορρίψατε όλα τα συστατικά όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση σύμφωνα με τους, κατά τόπους, κανονισμούς.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Κύτταρα: Η σπλήνα πρέπει να συλλέγεται σύμφωνα με τις διαδικασίες συλλογής. Η σπλήνα πρέπει να υφίσταται επεξεργασία μέσα σε 72 ώρες από την συλλογή. Τα περιφερικά λεμφοκύτταρα αίματος πρέπει να συλλέγονται σε φιαλίδια ηπαρίνης νατρίου ή ACD με ασηπτική τεχνική και πρέπει να υφίσταται επεξεργασία μέσα σε 72 ώρες από την συλλογή.

Ορός: Το αίμα πρέπει να συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικό (ορό) με χρήση ασηπτικής τεχνικής και πρέπει να εξετάζεται ενόσω είναι ακόμη φρέσκο για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα απόκτησης αντιδράσεων ψευδώς θετικών ή ψευδώς αληθών εξ' αιτίας ακατάλληλης αποθήκευσης ή μόλυνσης του δείγματος.

Τα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να εξεταστούν αμέσως , πρέπει είτε να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8°C επί όχι περισσότερο από 48 ώρες, είτε να καταψύχονται. Τα δείγματα που καταψύχονται σε θερμοκρασία -20°C ή χαμηλότερη, παραμένουν σε καλή κατάσταση για αρκετό καιρό (2 χρόνια). Ωστόσο, προκειμένου να αποφευχθούν οι καταστροφικές

επιπτώσεις της επαναλαμβανόμενης κατάψυξης-απόψυξης, συνιστάται η τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικά φιαλίδια κατάψυξης και η αποθήκευσή τους σε μικρές ποσότητες στην κατάψυξη. Αποφύγετε την χρήση καταψυκτών αυτόματης απόψυξης.

Ο ορός θα πρέπει να διαχωρίζεται από τα ερυθρά κύτταρα όταν αποθηκεύεται ή αποστέλλεται.

Σωματίδια ή συσσωματώματα στο δείγμα ενδέχεται να προκαλέσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή λανθασμένες τιμές στις επαναληπτικές εξετάσεις. Τα περιέχοντα σωματίδια δείγματα πρέπει να καθαρίζονται με φυγοκέντριση προ της ανάλυσης.

Μόνο ολικός ανθρώπινος ορός είναι κατάλληλος για αυτήν την ανάλυση. Προαραίωση των δειγμάτων με οτιδήποτε άλλο εκτός από ανθρώπινο ορό, που δεν περιέχει αντισώματα σε HLA γλυκοπρωτεΐνες, θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Αποφύγετε την χρήση μικροβιακά μολυσμένων, λιπαιμικών, ικτερικών, ή αδρανοποιημένων με θέρμανση δειγμάτων, διότι μπορεί να προκύψουν μη συνεπή αποτελέσματα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρεχόμενα Υλικά:

Τα φιαλίδια ενδεχομένως να περιέχουν περισσότερο αντιδραστήριο από το περιγραφόμενο στις ετικέτες. Βεβαιωθείτε ότι μετράτε το αντιδραστήριο με μια κατάλληλη συσκευή κατά την αραιώση.

1. 12 – 1 x 8 σειρές μικροβυθισμάτων μικρού όγκου με πλαίσιο, που περιέχουν συνδεδεμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των HLA τάξης I γλυκοπρωτεϊνών κωδικοποιημένες με μωβ γραμμή.
2. 12 – 1 X 8 μικρού όγκου σειρές μικροβυθίων, χρωματικά κωδικοποιημένες μώβ, με πλαίσιο που περιέχουν μονοκλωνικό αντίσωμα για HLA τάξης II γλυκοπρωτεΐνες.
3. 1 x 125 mL Συμπυκνωμένο Πλυστικό
4. 1 x 14 mL Δείγμα Διαλύτη
5. 1 x 14 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος
6. 1 x 14 mL Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης
7. 1 x 120 μL Σύζευγμα Αντιανθρώπινης IgG
8. 1 x 14 mL Κυτταρόλυμα και Διαλύτης Σύζευγματος.
9. 1 x 2.5 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης Λεμφοκυττάρων
10. 1 x 14 μL Αντιδραστήριο Ορού Ελέγχου Κυτταρολύματος (Τάξη I)
11. 1 x 14 μL Αντιδραστήριο Ορού Ελέγχου Κυτταρολύματος (Τάξη II)
12. 1 x Ορός ελέγχου ιζήμα αφυγρασμένων Λεμφοκυττάρων
13. 6 x 50 mg PNPP Υπόστρωμα
14. 1x 200 μL Θετικός ορός ελέγχου
15. 1 x 200 μL Αρνητικός ορός ελέγχου
16. 18 Ταινίες σφράγισης Πλακών

Πρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά:

1. Δοκιμαστικοί σωλήνες για τα δείγματα ασθενών και αραιώσεις ορών ελέγχου και αντιδραστηρίων
2. Πιπέττες μεταφοράς
3. Προσαρμοσμένες μικροπιπέττες διανομής 1-10 μL, 10 – 100 μL, και 100 – 1000 μL και ρύγχη μιας χρήσης
4. Χρονόμετρο
5. Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας ικανή να μετρά ΟΠ σε 405 ή 410
6. Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
7. Απορροφητικές πετσέτες χαρτιού
8. Συσκευή πλύσης μικροπλάκας
9. Συσκευή φυγοκέντρισης για τον διαχωρισμό του ορού ή του πλάσματος των δειγμάτων των ασθενών.
10. Συσκευή επώασης ή υδατόλουτρο 37°C
11. Μέσο κυτταροκαλλιέργειας
12. Μέσο Διαχωρισμού Λεμφοκυττάρων (1.077 g/mL)
13. Πάγος

Αυτή η διαδικασία αποτελείται από τρία κύρια μέρη: « Παρασκεύασμα Κυτταρολύματος Ορού Ελέγχου», « Παρασκεύασμα Κυτταρολύματος Δότη » και «Διαδικασία Ανάλυσης». Βοηθητικές Υποδείξεις:

1. Το κυτταρόλυμα δότη και ορού Ελέγχου μπορεί να παρασκευάζεται εκ των προτέρων και τα φιαλίδια κατάψυξης να καταψύχονται σε -70 έως -80°C . Αν το κυτταρόλυμα του δότη και του ορού ελέγχου έχουν παρασκευασθεί εκ των προτέρων, ανατρέξτε στην «Διαδικασία Ανάλυσης».
2. Για κάθε χρησιμοποιούμενο στην ανάλυση κυτταρόλυμα δότη, πρέπει να συμπεριλαμβάνονται ένας Αρνητικός Ορός Ελέγχου και ένας Ορός Ελέγχου Κυτταρολύματος.
3. Πρέπει επίσης να συμπεριλαμβάνεται ο ορός ελέγχου του Αντιδραστηρίου. (Θετικός Ορός Ελέγχου) σε κάθε ανάλυση Τάξης I και Τάξης II.
4. Για να μειώσετε την αποδομητική διεργασία των πρωτεασών στις HLA γλυκοπρωτεΐνες, τα κυτταρόλυμα μπορούν να παραμένουν σε πάγο για μικρό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 4 ωρών.
5. Παγώστε άμεσα κάθε υπόλειμα μη αραιωμένου δότη ή κυτταρόλυμα ελέγχου σε aliquots (μονής χρήσης) σε προστατευμένα και ταυτοποιημένα σωληνάρια στους -70 έως -80°C για έως 2 χρόνια.
6. Είναι σημαντικό να φυγοκεντρίτε στις προτεινόμενες rcf. ΜΗΝ ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΤΕ την προτεινόμενη ταχύτητα φυγοκέντρωσης.

Προετοιμασία του Αφυγρασμένου ορού Ελέγχου Λεμφοκυττάρων:

1. Επανενοδάτωση του Αφυγρασμένου ορού Ελέγχου Λεμφοκυττάρων
 - a) Επανενοδάτωση του Αφυγρασμένου ορού Ελέγχου Λεμφοκυττάρων (DLC) με την πρόσθεση 500 μL μέσω πλήρους κυτταρικής καλλιέργειας στο σβόλο των αφυγρασμένων κυττάρων.
 - b) Αφήστε να μείνουν σε θερμοκρασία δωματίου επί τουλάχιστον 1 ώρα.
 - c) Διασπάστε πλήρως το σφαιρίδιο των κυττάρων με την άκρη της πιπέτας για να αποκτήσετε ένα ομοιογενές εναιώρημα κυττάρων.
 - d) Φυγοκεντρίστε το μείγμα σε 1,000 με 1,500 rcf επί 5 λεπτά έως ότου τα κύτταρα σχηματίσουν σβόλο.
 - e) Αφήστε το υπερκείμενο πάνω στα κύτταρα, έως ότου είναι η ώρα για τη λύση των κυττάρων.
2. Λύση του ορού Ελέγχου Λεμφοκυττάρων
 - a) Προετοιμάστε 0.5 mL από το έτοιμο Ρυθμιστικό διάλυμα Λύσης Λεμφοκυττάρων προσθέτοντας 50 μL of Ρυθμιστικό Διάλυμα σε 450 μL απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Αποθηκεύστε το αραιωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα σε πάγο έως 4 ώρες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης Λεμφοκυττάρων είναι ιζώδες. Εμβαπτίστε το ρύγχος 2-3 φορές στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Λεμφοκυτταρικής Λύσης πριν την διανομή και ξεπλύνετε μετά με την πρόσθεση απιονισμένου νερού. Ανακατέψτε καλά .

- b) Αφαιρέστε το υπερκείμενο από τον ενυδατωμένο ορό ελέγχου λεμφοκυττάρων (DLC).
- c) Ο ενυδατωμένος ορός ελέγχου (DLC) πρέπει να λυθεί σε 500 μL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Ανακινείστε καλά με πιπέτα και με την βοήθεια του vortex για να επαναδιαλυτοποιήσετε εντελώς τα κύτταρα. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 1,000 έως 1,500 rcf για 3 – 5 λεπτά ώστε να ιζηματοποιήσετε τις κυτταρικές μεμβράνες. Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε καθαρό σεσημασμένο σωληνάριο.
- d) Το κυτταρόλυμα ορού ελέγχου πρέπει να φυλάσσεται σε πάγο μέχρι την χρήση του (μέσα σε 4 ώρες). Μπορεί να αποθηκευτεί στους -70 έως -80°C για μελλοντική χρήση.

Προετοιμασία Λύσης κυττάρων Δότη

- 1) Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Με Χρήση του Φύλλου Καταγραφής

 - a) Ορίστε την τοποθεσία για κάθε ένα από τα δείγματα υπό εξέταση ορού με την χρήση των Φύλλων Καταγραφής της Τάξης I και Τάξης II.
 - b) Συμπληρώστε τον πρώτο υπολογισμό στο Φύλλο Υπολογισμού του Κυτταρολύματος για τον προσδιορισμό της απαιτούμενης ποσότητας του αραιωμένου κυτταρολύματος.
 - c) Συμπληρώστε τον δεύτερο υπολογισμό για τον προσδιορισμό της απαιτούμενης ποσότητας του αναραίωτου κυτταρολύματος για τις ταινίες της τάξης I.
 - d) Συμπληρώστε τον τρίτο υπολογισμό για να προσδιορίσετε τον απαιτούμενο όγκο του αναραίωτου κυτταρολύματος για τις ταινίες της τάξης II.

- e) Για τον τέταρτο υπολογισμό, προσθέστε τον όγκο του κυτταρολύματος της Τάξης I στον όγκο του κυτταρολύματος της Τάξης II για την απόκτηση του απαιτούμενου συνολικού αναραιώτου κυτταρολύματος
- f) Χρησιμοποιείτε τον τελευταίο υπολογισμό για τον προσδιορισμό του όγκου των κυττάρων που πρέπει να προετοιμαστεί.
- g) Σημειώστε όλες τις αραιώσεις και τους υπολογισμούς στο φύλο εργασίας.

2) Απομόνωση των Κυττάρων του Δότη (Isolating Donor Cells)

Η συλλογή των λεμφοκυττάρων μπορεί να γίνει είτε από πλήρες αίμα είτε από την σπλήνα. Το πλήρες αίμα ή η σπλήνα πρέπει να υποστεί επεξεργασία στις επόμενες 72 ώρες από την συλλογή. Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (22 to 25°C) πριν την επεξεργασία.

Πλήρες Αίμα:

- a) Εάν χρησιμοποιείτε πλήρες αίμα, βάλτε μια στρώση σε μέσο διαχωρισμού λεμφοκυττάρων (1.077 g/ml) και φυγοκεντρίστε σε 1,000 με 1,500 rcf επί 15 έως 20 λεπτά. Συλλέξτε τη στρώση των κυττάρων. Πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των ερυθρών κυττάρων στο παρασκεύασμα.
- b) Μεταφέρετε το εναιώρημα σε ένα μεγάλο σωλήνα και φυγοκεντρίστε σε 1,000 με 1,500 rcf επί 15 έως 10 λεπτά για να σχηματιστούν σβώλοι κυττάρων. Αφαιρέστε το υπερκείμενο υλικό.
- c) Διανείμετε έναν όγκο πλήρους κυτταρικής καλλιέργειας ίσο με τουλάχιστον 5 φορές τον όγκο του σβώλου. Αναδέψτε ήπια τα κύτταρα.
- d) Φυγοκεντρίστε έως ότου τα κύτταρα σχηματίσουν σβώλους και αφαιρέστε το υπερκείμενο υλικό.
- e) Επαναλάβετε τα στάδια c) και d) επί συνολικά 3 πλύσεις.
- f) Μετά την τελική πλύση αφήνετε το υπερκείμενο υλικό πάνω στα κύτταρα, έως ότου διενεργηθεί λύση κυττάρων.

Σπλήνα:

- a) Για την παρασκευή λεμφοκυττάρων από σπλήνα, εμποτίστε ώστε να διαλυθεί ο ιστός σε μικρά σωματίδια, εναιωρείστε σε πλήρους υλικού κυτταροκαλλιέργειας, βάλτε μια στρώση σε υλικό διαχωρισμού λεμφοκυττάρων (1.077 g/mL) και φυγοκεντρίστε σε 1,000 με 1,500 rcf επί 15 έως 20 λεπτά. Συλλέξτε τη στρώση των κυττάρων στην ενδιάμεση φάση του μέσου διαχωρισμού λεμφοκυττάρων (1.077 g/mL).
- b) Μεταφέρετε το εναιώρημα σε ένα μεγάλο σωληνάριο και φυγοκεντρίστε σε 1,000 με 1,500 rcf επί 15 έως 10 λεπτά για να σχηματίσουν σβώλους τα κύτταρα. Αφαιρέστε το υπερκείμενο υλικό.
- c) Διανείμετε έναν όγκο πλήρους κυτταρικής καλλιέργειας ίσο με τουλάχιστον 5 φορές τον όγκο του σβώλου. Αναδέψτε ήπια τα κύτταρα.
- d) Φυγοκεντρίστε έως ότου τα κύτταρα σχηματίσουν σφαιρίδια και αφαιρέστε το υπερκείμενο υλικό. (πρώτη πλύση)
- e) Επαναλάβετε τα στάδια c) και d) επί συνολικά 3 πλύσεις.
- f) Μετά την τελική πλύση αφήνετε το υπερκείμενο υλικό πάνω στα κύτταρα, έως ότου διενεργηθεί λύση κυττάρων.

3) ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΔΟΤΗ

- a) Για κάθε 100 μL των προς λύση συμπιεσμένων λεμφοκυττάρων, προετοιμάστε 1.0 mL αραιωμένου Ρυθμιστικού Διαλύματος Λύσης προσθέτοντας 100 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος Λύσης σε 900 μL απιονισμένο νερό. Αποθηκεύστε το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα σε πάγο μέχρι 4 ώρες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης Λεμφοκυττάρων είναι ιζώδες. Εμβαπτίστε το ρύγχος 2-3 φορές στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Λεμφοκυτταρικής Λύσης πριν την διανομή και ξεπλύνετε μετά από την πρόσθεση απιονισμένου νερού. Ανακατέψτε καλά.

- b) Μεταφέρετε τον απαιτούμενο όγκο των κυττάρων του δότη σε δοκιμαστικό σωλήνα με μία από τις κάτωθι δύο μεθόδους:
 - i)
 - Αφαιρέστε το υπερβάλλον υλικό από το σφαιρίδιο των εκπλυμένων κυττάρων.
 - Προσθέστε έναν ίσον όγκο του πλήρους υλικού κυτταροκαλλιέργειας στο σβώλο των κυττάρων για να κάνετε ένα κυτταρικό εναιώρημα 50%.
 - Ανακατέψτε καλά και μεταφέρετε τον διπλάσιο όγκο των απαιτούμενων συμπιεσμένων κυττάρων (τα οποία έχουν υπολογισθεί στο στάδιο 1) σε δοκιμαστικό σωλήνα.
 - Φυγοκεντρίστε το κυτταρικό εναιώρημα σε 1,000 έως 1,500 rcf επί 5 έως 10 λεπτά για να αποκτήσετε σφαιρίδιο περιέχον τον επιθυμητό όγκο λεμφοκυττάρων.

- Ο συμπιεσμένος κυτταρικός όγκος μπορεί να πιστοποιηθεί προσθέτοντας έναν ίσο όγκο νερού σε έναν πανομοιότυπο δοκιμαστικό σωλήνα και κατόπιν μετρώντας τον όγκο του νερού.
 - Αφαιρέστε το υπερκείμενο
- c) Για κάθε 10 μL συμπιεσμένα λεμφοκύτταρα δότη ($\approx 30 \times 10^6$ cells) προσθέστε 100 μL από προαραιωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Λύσης. Αναμίξτε καλά με πιπέτα και vortex ώστε να διαλυτοποιηθούν εντελώς τα κύτταρα. Φυγοκεντρίστε το μίγμα στις 1,000 έως 1,500 rcf για 3 – 5 λεπτά για να κατακρυσμάνετε τις κυτταρικές μεμβράνες. Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε καθαρό σεσημασμένο σωληνάριο.
- ii) Εναλλακτικά, μετρήστε τα λεμφοκύτταρα και μεταφέρετε (με την χρήση του ακόλουθου πίνακα) τον κατάλληλο αριθμό κυττάρων στον δοκιμαστικό σωλήνα πολυπροπυλενίου. Φυγοκεντρίστε 1,000 με 1,500 rcf για 5 λεπτά για να αποκτήσετε ένα σφαιρίδιο λεμφοκυττάρων. Αφαιρέστε το πλεονάζον υλικό.

Όγκος Συμπιεσμένων Λεμφοκυττάρων	Υπολογισθείς # Λεμφοκυττάρων Αποκτηθέντων από Περιφερικό Αίμα	Υπολογισθείς # Λεμφοκυττάρων Αποκτηθέντων από Κύτταρα Σπληνός.
10 μL	30×10^6 Κύτταρα	30×10^6 Κύτταρα
20 μL	50×10^6 Κύτταρα	60×10^6 Κύτταρα

Εαν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί παγωμένο κυτταρόλυμα, ξεπαγωστε το δείγμα μόλις πριν την χρήση και αραιώστε ανάλογα όπως περιγράφεται στο βήμα 4 της Διαδικασίας (βλ. παρακάτω).

Για Τάξης I: χρειάζονται ανά βοθρίο., 2 μL αναραιώτου κυτταρολύματος ή 6×10^5 λυμένα κύτταρα.

Για Τάξης II, χρειάζονται ανα βοθρίο: 4 μL αναραιώτου κυτταρολύματος ή 12×10^5 λυμένα κύτταρα.

Διαδικασία Ανάλυσης

1. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (22 – 25°C).
2. Φτιάξτε το διάλυμα Πλυστικού, αραιώνοντας το (TCW). Προσθέστε 1 όγκο Συμπυκνωμένου Πλυστικού σε 9 Όγκους απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού. Αναμείξτε καλά.
3. Καθορίστε τον αριθμό των, προς εξέταση, δειγμάτων των ασθενών.
4. Αραιώστε κατάλληλη ποσότητα κυτταρολύματος δότη ή κυτταρολύματος Ορού Ελέγχου Αφυγρασμένων Λεμφοκυττάρων σε Κυτταρόλυμα και Διαλύτη Συζεύγματος (LCD), σύμφωνα με τους υπολογισμούς στο φυλλάδιο εργασίας, ως κάτωθι:
 - a) Σημάνετε ένα σωληνάριο «Κυτταρόλυμα Δότη Τάξης I». Προετοιμάστε την κατάλληλη ποσότητα με αραιώση 1 μέρους κυτταρολύματος με 8 μέρη Κυτταρόλυμα και Διαλύτη Συζεύγματος (LCD). Ισχύει για τα τάξης I.
 - b) Σημάνετε ένα δεύτερο σωληνάριο «Κυτταρόλυμα Δότη Τάξης II». Προετοιμάστε την κατάλληλη ποσότητα με αραιώσης 1 μέρους κυτταρολύματος με 3 μέρη Κυτταρόλυμα και Διαλύτη Συζεύγματος (LCD). Ισχύει για τα τάξης II.
 - c) Σημάνετε ένα τρίτο σωληνάριο «Ορός Ελέγχου Αφυγρασμένων Λεμφοκυττάρων». Προετοιμάστε μια αραιώση με 1 μέρος ορού ελέγχου με 3 μέρη Κυτταρολύματος και Διαλύτη Συζεύγματος (LCD). Σημειώστε πως η αραιώση αυτή είναι κοινή και για τα τάξης I και II, και πρέπει να χρησιμοποιηθεί στα βυθίσματα και των δύο τύπων ταινιών.
5. Αφαιρέστε τα πλαίσια (MS1 ή και MS2) από την θήκη τους. Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών MS1 και MS2. Τοποθετείστε και κλείστε καλά τις υπόλοιπες ταινίες στην θήκη τους.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Παρέχονται μόνο δύο πλαίσια στήριξης στο διαγνωστικό σύνολο. Μην τα πετάτε έως ότου, έχουν χρησιμοποιηθεί όλες οι ταινίες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Προσανατολίστε τα βοθρία με το A1 στην άνω αριστερή γωνία. Βεβαιωθείτε πως όλα τα βοθρία είναι σωστά τοποθετημένα και βαθιά στις εγκοπές τους. Αριθμείστε κάθε σειρά για να αποφύγετε λάθη. Διατηρείστε την ίδια κατεύθυνση στην μικροπλάκα σε όλη την διάρκεια της εξέτασης.

6. Διανείμετε 15 μL αραιωμένου Ορού Ελέγχου Κυτταρολύματος Αφυγρασμένων Λεμφοκυττάρων στα βυθίσματα των ταινιών Τάξης I και II τα προσδιορισμένα ως : Ορός Ελέγχου Αντιδραστήριου.
7. Διανείμετε 15 μL αραιωμένου Κυτταρολύματος του δότη, τάξης I και II, σε όλα τα βυθίσματα : ασθενούς, Αρνητικού ορού Ελέγχου, και Ορού ελέγχου Κυτταρολύματος, σε κάθε ταινία τάξης I (μπλε) και τάξης II (μωβ).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: *Αν εξετάζονται πολλαπλά δείγματα ασθενών ταυτόχρονα, ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΤΕ ΕΤΙΚΕΤΕΣ ΣΕ ΚΑΘΕ ΤΑΙΝΙΑ ΠΡΟΣ ΑΠΟΦΥΓΗ ΛΑΘΩΝ.*

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: *Μην διανείμετε κυτταρόλυμα, δείγματα ή αντιδραστήρια στα κενά βυθίσματα. Βεβαιωθείτε ότι διανείμετε το αραιωμένο κυτταρόλυμα της τάξης I, στις μπλε ταινίες, και το αραιωμένο κυτταρόλυμα της τάξης II, στις μωβ ταινίες.*

8. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία κάλυψης πλακών και επώαστε για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Εάν χρησιμοποιηθεί ξηρό επωαστικό, αυξήσατε τον χρόνο επώασης κατά 10 λεπτά.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ

9. Αραιώστε τον Θετικό Ορό Ελέγχου (PC), τον Αρνητικό Ορό Ελέγχου (NC), και τον ορό ασθενούς σε Διαλύτη Δείγματος (SD) ως ακολούθως και ανακατέψτε καλά.

	Όγκο Διαλύτη Δείγματος (SD)	Όγκο Δείγματος
PC	60 μ L	20 μ L
NC (κυτταρόλυμα ανά δότη)	60 μ L	20 μ L
Δείγμα Ασθενούς (κυτταρόλυμα ανά δότη)	60 μ L	20 μ L

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: *Αυτό θα δώσει αρκετά δείγματα για την εξέταση δύο βυθισμάτων τάξης I, και δύο βυθισμάτων τάξης II. Φυγοκεντρίστε τους ορούς των ασθενών σε υψηλή ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο για 5-10 λεπτά. Χρησιμοποιήστε το υπερκείμενο.*

10. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 140 μ L, Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

11. Με τη χρήση του Φύλλου Καταγραφής ως οδηγό, διανείμετε τα αραιωμένα δείγματα ασθενούς και τα αντιδραστήρια του ορού ελέγχου στα προσδιορισμένα βυθίσματα, ως ακολούθως:

- Διανείμετε 15 μ L αραιωμένου Θετικού Ορού Ελέγχου στα βυθίσματα του Ορού Ελέγχου του Αντιδραστηρίου και των δύο ταινιών που περιέχουν κυτταρόλυμα Ορού Ελέγχου Αφυγρασμένων Λεμφοκυττάρων.
- Διανείμετε 15 μ L αραιωμένου Αρνητικού Ορού Ελέγχου στα βυθίσματα του Αρνητικού Ορού Ελέγχου.
- Διανείμετε 15 μ L Κυτταρολύματος και Διαλύτη Συζεύγματος στα βυθίσματα του ορού Ελέγχου του Κυτταρολύματος των ταινιών τάξης I και II. Αυτό θα αποτρέψει την αφύγρανση των βυθισμάτων κατά την επόμενη περίοδο επώασης.
- Διανείμετε 15 μ L του αραιωμένου δείγματος ορού ελέγχου του ασθενούς στα προσδιορισμένα βυθίσματα που περιέχουν κυτταρόλυμα δότη στις ταινίες τάξης I και II

12. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία κάλυψης πλακών και επώαστε για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Εάν χρησιμοποιηθεί ξηρό επωαστικό, αυξήσατε τον χρόνο επώασης κατά 10 λεπτά.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: *Κατά την περίοδο της επώασης ακολουθείστε τα κάτωθι δύο βήματα:*

13. Αραιώστε 1 μέρος του Σύζευγμα (AG) με 100 μέρη Διαλύτη Κυτταρολύματος και Συζεύγματος (LCD). Χρησιμοποιήστε δοχείο πολυπροπυλενίου.

Ταινίες:	4 - 1x8	24 - 1x8
AG	7 μ L	50 μ L
LCD	700 μ L	5 mL

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Το Σύζευγμα είναι ιξώδες. Εμβαπτίστε το ρύγχος 2-3 φορές στο Σύζευγμα πριν το απορρίψετε και ξεπλύνετε μετά την πρόσθεση του Διαλύτη Κυτταρολύματος και Συζεύγματος. Ανακατέψτε καλά.

14. Αραιώστε τα Αντιδραστήρια του Ορού Ελέγχου του Κυτταρολύματος (**LCRI Και LCRII**) σε Διάλυμα Κυτταρολύματος και Συζεύγματος (**LCD**) ως κάτωθι:

LCRI ή LCRII	2 μ L
LCD	198 μ L

Ανακατέψτε καλά.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Η ακριβής Μέτρηση στα αντιδραστήρια LCR είναι σημαντική στην απόκτηση αποδεκτών τιμών Ορού Ελέγχου Κυτταρολύματος.

15. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 140 μ L, Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Είναι σημαντικό να αφαιρέσετε τελείως όλο το πλυστικό διάλυμα μετά την τελευταία πλύση.

16. Διανείμετε 15 μ L ανά βύθισμα των αραιωμένων Αντιδραστηρίων του Ορού Ελέγχου του Κυτταρολύματος στα κατάλληλα βυθίσματα του Ορού Ελέγχου του Κυτταρολύματος:

- διανείμετε αραιωμένο LCRI στις ταινίες τάξης I (μπλε)
- διανείμετε αραιωμένο LCRII στις ταινίες τάξης II (μωβ).

17. Διανείμετε 15 μ L, ανά βύθισμα, του αραιωμένου Συζεύγματος (παρασκευασμένου σε προηγούμενο στάδιο παραπάνω), σε όλα τα εναπομείναντα βυθίσματα, εκτός των βυθισμάτων του Ορού Ελέγχου του Κυτταρολύματος, και των Κενών βυθισμάτων.

18. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία κάλυψης πλακών και επώαστε για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Εάν χρησιμοποιηθεί ξηρό επωαστικό, αυξήσατε τον χρόνο επώασης κατά 10 λεπτά.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Κατά την περίοδο της επώασης ακολουθείστε τα κάτωθι δύο βήματα.

19. Αραιώστε το Υπόστρωμα PNPP (**PN**) προσθέτοντας 0.5 mL αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό στο φιαλίδιο. Επανατοποθετείστε το Διάλυμα Διακοπής της Αντίδρασης (stopper), και ανακατέψτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.

20. Αραιώστε το PNPP (**PN**) με το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος (**SB**) σε αναλογία 1 προς 100.

Ταινίες	4 - 1x8	24 - 1x8
PN	20 μ L	120 μ L
SB	2 mL	2 mL

Αναμειξτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση. Μπορεί να παραμείνει έως 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (22-25°C) πριν την χρήση.

21. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 140 μ L, Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 πλυσίματα.

- ε) Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλαστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

Προχωρήστε άμεσα στα επόμενα τρία στάδια.

22. Προσθέτετε 50 μL του αραιωμένου διαλύματος PNPP σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ αυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.

23. Αφήστε τα μικροβυθίσματα να σταθούν στο σκοτάδι επί 30 λεπτά σε ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (22-25°C).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασία μετά την πρόσθεση του PNPP είναι κρίσιμα. ΜΗΝ τροποποιήσετε τους προκαθορισμένους χρόνους επώασης και την θερμοκρασία. Για λόγους διατήρησης σταθερότητας, ξεκινήστε την χρονομέτρηση αμέσως μετά την πρόσθεση του αντιδραστηρίου στο πρώτο βύθισμα.

24. Διακόψτε την αντίδραση προσθέτοντας 50 μL Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης (SS) σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά με την οποία προσετέθη το υπόστρωμα. Προσθέστε 100 μL Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης στα τυφλά βυθίσματα.

25. Διαβάστε την απορρόφηση (ΟΠ) κάθε βυθίσματος στα 405 ή 410 nm. Εάν τα αποτελέσματα δεν μπορούν να διαβαστούν αμέσως επιστρέψτε τα βυθίσματα σε σκοτεινό μέρος και αφήστε τα να μείνουν έως και 30 λεπτά.

ΣΗΜ: Μην χρησιμοποιείτε φίλτρο αναφοράς στο φωτόμετρο.

26. Αφαιρέστε τις αποκτηθείσες τιμές από τα τυφλά βυθίσματα από όλα τα βυθίσματα δειγμάτων και ορών ελέγχου. Πολλές συσκευές ELISA είναι προγραμματισμένες να διεκπεραιώνουν αυτό το στάδιο αυτόματα.

27. Καταγράψτε τα αποτελέσματα στο Φύλλο Καταγραφής Αποτελεσμάτων.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο ποιοτικός έλεγχος του MICROAMS[®] είναι ενσωματωμένος στο σύστημα ανάλυσης με την συμπερίληψη των Αρνητικού και Θετικού Ορών Ελέγχου και του Ορού ελέγχου Κυταρολύματος. Αυτοί οι οροί ελέγχου πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε εξέταση προκειμένου να προσδιορίζονται τυχόντα τεχνικά λάθη και λάθη αντιδραστηρίων.

Κριτήρια αξιόπιστης εξέτασης:

	Αρνητικός ορός Ελέγχου (NC)	Έλεγχος Αντιδραστηρίου (PC)
Μέσος όρος OD (ΟΠ= Οπτική Πυκνότητα)	≤ 0.300	≥ 1.000

Τα βυθίσματα του Θετικού Ελέγχου κυταρολύματος (Lysate Control Reagent) πρέπει να δείχνουν θετική αντιδραστικότητα (>2X φορές της τιμής του μέσου αρνητικού). Η θετική αντίδραση στα βυθίσματα αυτά δείχνει πως οι γλυκοπρωτείνες HLA έχουν δεσμευτεί. Αυτός ο έλεγχος δεν μπορεί απαραίτητα να καταδείξει ένα κυταρόλυμα με ακατάλληλη προεργασία ή προαραίωση, ή να εξασφαλίσει την σωστή ορολογική αντιδραστικότητα της γλυκοπρωτεΐνης.

Σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν 35 διαφορετικά λύματα από σπλήνα τυπικά αποτελέσματα για τάξης I βυθίσματα ελέγχου έδειξαν ένα εύρος Οπτικής Πυκνότητας από 1.255 – 3.049 με μέσο όρο 2.124 και για τα Τάξης II, ένα εύρος 0.766 – 2.366 με μέσο όρο 1.808.

Οι Οπτικές Απορροφήσεις για τα θετικά δείγματα ασθενών εις διπλούν πρέπει να βρίσκονται στο 20% του μέσου όρου. Δείγματα των οποίων τα αποτελέσματα είναι εκτός του ορίου αυτού πρέπει να ελέγχονται ξανά. Δείγματα των οποίων τα αποτελέσματα βρίσκονται εκτός του ορίου αυτού, πρέπει να επανεξετάζονται.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Η κακή επαναληψιμότητα των διπλών μπορεί να είναι αποτέλεσμα παράλειψης του αντιδραστηρίου ή του δείγματος, ανομοιόμορφη διανομή ή ανάμειξη αντιδραστηρίων, ανομοιόμορφη θερμοκρασία κατά την επώαση, απ' ευθείας έκθεση στο φως κατά την τελευταία επώαση ή επιμόλυνση μεταξύ των βιοθρίων. Η αποτυχία των διπλών στην εξέταση, ενδεχομένως να οδηγήσει στην αποδοχή λανθασμένων αποτελεσμάτων.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων με τιμές ΟΠ ίσες ή μεγαλύτερες από 2X την αποκτηθείσα τιμή του μέσου όρου των αρνητικών ορών ελέγχου θεωρούνται θετικά αποτελέσματα.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Τα λανθασμένα αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από βακτηριακή μόλυνση των υλικών της εξέτασης, ανεπαρκείς χρόνους επώασης, ανεπαρκείς ή πλημμελείς πλύσεις των υπό εξέταση βυθισμάτων, έκθεση του υποστρώματος σε απ' ευθείας φως, έκθεση σε υψηλότερες ή χαμηλότερες από τις συνιστώμενες θερμοκρασίες, ανεπαρκή ή υπερβολικά αιμοπετάλια ή παράλειψη κάποιου σταδίου.

Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή συσσωματωμάτων ανοσοσφαιρίνης στο δείγμα του ασθενούς, ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένη μη-ειδική δέσμευση και να παράξει ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην ανάλυση.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση μιας κλινικής απόφασης.

Κάποιοι χαμηλοί τίτλοι, χαμηλής δεσμευτικότητας αντισώματα, μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με την χρήση αυτής της ανάλυσης.

Αυτή η εξέταση εντοπίζει αντισώματα IgG, μόνο.

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης αυτού του προϊόντος παράχθηκαν με την χρήση ορών με αντισώματα γνωστής αντιδραστικότητας έναντι των επιτόπων HLA A, B, και DR.

ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Προκειμένου να διασφαλιστεί η αντιδραστικότητα και η ειδικότητα, κάθε παρτίδα MICROAMS[®] εξετάζεται πριν κυκλοφορήσει, έναντι δείγματα που περιέχουν αντισώματα δότη ειδικά ως προς HLA.

Αξιολόγηση Απόδοσης

Η MICROAMS[®] έχει ελεγχθεί έναντι της μεθόδου της GTI Antibody Monitoring System (AMS[®]) σε μελέτη σύγκρισης. Ένα σύνολο 100 δειγμάτων αξιολογήθηκε στο MICROAMS[®] και AMS[®] για αντιδραστικότητα στα Τάξης I HLA. Ένα σύνολο 100 δειγμάτων αξιολογήθηκε στα MICROAMS[®] και AMS[®] για αντιδραστικότητα στα Τάξης II HLA.

		AMS [®] Class I		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
MICROAMS [®] Τάξης I	Θετικό	52	0	52
	Αρνητικό	0	49	49
	Σύνολο	52	49	101

Συμφωνία: 100%

Συγκριτική Μέθοδος: GTI Antibody Monitoring System: HLA Τάξης I και Τάξης II (AMS[®] 1+2)

Τάξης I	Συν-θετικότητα:	Συν-αρνητικότητα:
Τιμή	100%	100%
95% διάστημα εμπιστοσύνης (κάτω)	93.1%	92.7%
95% διάστημα εμπιστοσύνης (άνω)	100%	100%

		AMS [®] Class II		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
MICROAMS [®] Τάξης II	Θετικό	49	0	49
	Αρνητικό	0	52	52
	Σύνολο	49	52	101

Συμφωνία: 100%
Συγκριτική Μέθοδος : GTI Antibody Monitoring System: HLA Τάξης I και Τάξης II (AMS®1+2)

Τάξης II	Συν-θετικότητα:	Συν-αρνητικότητα:
Τιμή	100%	100%
95% διάστημα εμπιστοσύνης (κάτω)	92.7%	93.1%
95% διάστημα εμπιστοσύνης (άνω)	100%	100%

Ακρίβεια

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας του AMS1+2, διενεργήθηκαν μελέτες ενδοανάλυσης και μεταξύ αναλύσεων. Η αξιολόγηση όλων των δεδομένων διενεργήθηκε σύμφωνα με το NCCLS Πρωτόκολο Χρήστη για την Αξιολόγηση της Απόδοσης Ποιοτικού Τεστ.: Εγκεκριμένες Οδηγίες EP12-A.

Τα δεδομένα των αποτελεσμάτων έδειξαν 100% συμφωνία στην ίδια ανάλυση (n=20), 100% συμφωνία στην ανάλυση από μέρα σε μέρα (n=40), και 100% συμφωνία από παρτίδα σε παρτίδα (3παρτίδες, n=24)

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

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, 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 OR 1-800-233-1843

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

- ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
- ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΕ 2-8°C



REF M-AMS

Αναθεωρήθηκε 2007-10-22 (Gr)



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

www.gtidiagnostics.com