

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

USO

MICROAMS® è un ELISA in fase solida preparato per determinare qualitativo prodotto per determinare anticorpi anti HLA IgG di classe I e II donatore specifici.

Per uso diagnostico in vitro.

RIASSUNTO

Il sistema maggiore di istocompatibilità HLA è determinante nella sopravvivenza dell'organo nel trapianto e nella refrattarietà alla trasfusione piastrinica.¹ Gli alloanticorpi anti-HLA possono insorgere in seguito a gravidanza, in seguito a trasfusione di prodotti ematici e dopo trapianto. In genere l'alloimmunizzazione porta alla produzione di anticorpi anti HLA nel 33% di individui esposti.² Le molecole HLA di classe I e II sono glicoproteine di membrana polimorfiche. È stato dimostrato che gli anticorpi diretti verso le glicoproteine HLA ostacolano il successo del trapianto.³⁻⁶ Il monitoraggio di questi anticorpi dopo il trapianto è importante per seguire la sopravvivenza dell'organo.^{7,8}

PRINCIPIO

Le glicoproteine HLA sono preparate da linfociti solubilizzando le cellule con un detergente non-ionico. Una volta solubilizzate i linfociti lisati vengono dispensati in pozzetti rivestiti di anticorpi monoclonali, le glicoproteine non legate vengono rimosse mediante lavaggio. Il siero umano viene aggiunto ai pozzetti per ricercare anticorpi contro gli antigeni HLA. Anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio. Si aggiunge quindi una anti-IgG coniugata con fosfatasi alcalina, l'antiglobulina non legata è rimossa mediante lavaggio, si aggiunge infine il substrato enzimatico PNPP (p-nitrofenilfosfato) per lo sviluppo colore, dopo incubazione di 30 minuti la reazione è stoppata con una soluzione di idrossido di sodio, si misura quindi fotometricamente la densità ottica del colore sviluppato.

Il kit utilizza tre sistemi di controllo:

Il primo sistema consiste in linfociti disidratati e un anticorpo (siero di controllo positivo) reattivo con le glicoproteine di classe I e classe II presenti sui linfociti. I linfociti disidratati sono reidratati e solubilizzati per produrre un lisato. Il lisato è usato nel pozzetto reagente controllo. Il siero di controllo positivo è testato contro il controllo lisato per confermare che il tampone di lisi dei linfociti e gli altri reagenti hanno lavorato correttamente.

Il secondo sistema di controllo consiste in due anticorpi monoclonali coniugati con fosfatasi alcalina. Il reagente controllo di lisato di classe I è diretto verso le glicoproteine HLA di classe I, l'altro è diretto verso le glicoproteine di classe II. Questo reagente dà un risultato positivo quando testato dispensandolo direttamente nel pozzetto, dimostrando così che le molecole HLA di classe I o di classe II sono state catturate dal pozzetto.

Il terzo controllo è un controllo negativo. Sono considerate positive le reazioni con valori di DO superiori alla media dei valori dei controlli negativi X2.

REAGENTI

Numero massimo di test per kit: 44

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

- | | |
|------------|--|
| MS1 | 1. Microstrip: piccolo volume, microstrip a fondo piatto a cui sono legati anticorpi monoclonali specifici per HLA classe I (colore blue) e per HLA classe II (colore viola). Pronto all'uso. Le strip sono chiuse in busta di alluminio richiudibile. |
| MS2 | |
-
- | | |
|------------|---|
| TCW | 2. Soluzione di Lavaggio Concentrata (10x): Tampone Tris (hydroxymethyl) aminomethane contenente sodio cloride e Tween 20. 1% sodio azide. Diluire con acqua deionizzata o distillata prima dell'uso. Conservare la soluzione di lavaggio a temperature ambiente fino a 48 ore o fino a 7 giorni a 2 – 8°C. |
|------------|---|

- | | |
|--------------|--|
| SD | 3. Diluente Campione: Soluzione tampone, fosfato contenente albumina bovina., siero di ratto e 0.1% sodio azide. Pronto all'uso. |
| SB | 4. Tampone Substrato: questa soluzione contiene dietanolamina e magnesio cloride. 0.02% sodio azide. Pronto all'uso. Proteggere dalla luce. |
| SS | 5. Soluzione Stoppante: 3 M NaOH. Pronto all'uso. Usare con cautela. |
| AG | 6. Coniugato (100x): anti-globulina umana di capra coniugata con Fosfatasi alcalina G, (IgG). Contiene 0.1% sodio azide. (Colorato con tappo.) Diluire con diluente lisante e coniugato dell'uso. |
| LCD | 7. Diluente lisante e coniugato: tampone tris contenente sodio-cloride. Sodio-azide 0.05% (tappo blue). Pronto all'uso |
| LLB | 8. Tampone di lisi dei linfociti (10x): tampone salino tris contenente detergente non-ionico. Sodio-azide 0.5%. Diluire con acqua distillata prima dell'uso. |
| LCRI | 9. Reagente controllo lisato classe I (100x): anticorpo monoclonale specifico per classe I, anti globulina umana G (IgG) di ratto, coniugato con fosfatasi alcalina. Sodio-azide 0.1%. (tappo blue). Diluire con diluente Lisato e coniugato prima dell'uso. |
| LCRII | 10. Reagente controllo lisato classe II (100x): anticorpo monoclonale specifico per classe II, anti globulina umana G (IgG) di ratto, coniugato con fosfatasi alcalina. Sodio-azide 0.1%. (tappo viola). Diluire con diluente Lisato e coniugato prima dell'uso. |
| DLC | 11. Controllo linfociti disidratati: linfociti disidratati. Preparare come da istruzioni. |
| PN | 12. Substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato): in polvere. Sciogliere con acqua deionizzata o distillata e diluire nel tampone substrato prima dell'uso. Proteggere dalla luce. |
| PC | 13. Siero Controllo Positivo (4x): siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente Campione prima dell'uso. |
| NC | 14. Siero Controllo Negativo (4x): siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente Campione prima dell'uso. |
| PS | 15. Copripiastro. |

AVVERTENZE

- Non usare i reagenti torbidi o contaminati.
- Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
- La sostituzione dei componenti del kit con altri può portare a risultati del test sbagliati, comunque possono essere usati tutti i lotti del tampone di lisi dei linfociti per preparare il lisato.
- Strip e reagenti contenuti nel kit non devono essere usati in unione con altri kit.
- Per preparare le diluizioni, seguire le istruzioni del produttore per la scelta delle pipette appropriate.
- Per dispensare i reagenti dovrebbero essere usate pipette accuratamente calibrate.
- Linfociti aggregati prima della lisi provocano la produzione di lisato povero e quando testati con il reagente di controllo del lisato danno valori di DO bassi, è quindi importante trattare i linfociti con delicatezza per evitare l'aggregazione. La contaminazione con globuli rossi della sospensione di linfociti può diminuire la quantità di glicoproteine HLA nel lisato se non vengono rimossi prima del conteggio delle cellule.
- Centrifugazioni maggiori della velocità indicata possono causare una lisi precoce, aggregati e perdita di linfociti.
- I linfociti possono essere congelati da -70°C a -80°C prima dell'uso. I lisati non dovrebbero essere congelati.

- Usare con cautela per evitare la contaminazione del LCD, LCRI, LCRII e del Coniugato. L'eventuale contaminazione di questi reagenti con siero umano neutralizza il LCRI, LCRII e Coniugato e porta al fallimento del test.
- Dopo il test gettare qualsiasi residuo di coniugato diluito, di tampone di lisi diluito, di controllo della lisi diluito, dei controlli negativo e positivo diluiti e di PNPP ricostituito e diluito.
- L'incubazione finale con il substrato enzimatico è sensibile alla temperatura, dovrebbe essere eseguita in un'area a 22 – 25°C.
- A causa delle variazioni nella strumentazione o temperature ambientali più alte o più basse, può essere necessario per il laboratorio stabilire un tempo di incubazione più lungo o più breve in modo da ottenere risultati corretti. L'incubazione finale più avere effetti sui valori controllo, è quindi importante monitorare periodicamente il valore della temperatura ambientale.
- A causa del ridotto volume dei pozzetti degli strip, è necessario controllare il corretto allineamento del lettore.
- Non usare un filtro di riferimento quando si legge la piastra nel lettore per micropiastre.

PRECAUZIONI

- Il siero umano usato per i controlli Positivo e Negativo è stato testato e riscontrato negativo per anticorpi anti HIV, HCV e HBsAg con metodi FDA approvati. Nessun metodo può, comunque, offrire una assoluta sicurezza dell'assenza virus HIV, Epatite C e Epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tali materiali dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni dei reagenti forniti con i this kit contengono odio azide come conservante.
ATTENZIONE: Sodio azide reagisce con piombo e rame formando metalli di azidi esplosivi. Quando gettato nel lavandino sciacquare con molta acqua. Sodio azide è velenoso e tossico se ingerito.
- La Soluzione Stoppante (NaOH) è corrosiva. Evitare il contatto con pelle ed occhi. Gli schizzi devono essere puliti immediatamente.
- Quando i componenti del kit sono finite gettarli seguendo le regole locali.

RACCOLTA CAMPIONI

Cellule: la milza dovrebbe essere prelevata seguendo le normali procedure ed usata entro 72 ore dal prelievo. Linfociti da sangue periferico dovrebbero essere prelevati in eparina sodica o ACD con metodo asettico, conservati a temperatura ambiente ed usati entro 72 ore dal prelievo.

Siero: il sangue dovrebbe essere raccolto senza anticoagulante con tecnica asettica e dovrebbe essere testato quando ancora fresco per ridurre le possibilità di ottenere reazioni falso positive o falso negative causate da conservazione impropria o contaminazione dei campioni.

I campioni che non possono essere testati immediatamente possono essere conservati a 2 – 8°C per 48 ore o congelati. Campioni congelati a –20°C o oltre rimangono in buone condizioni per anni (2 anni). Comunque per evitare gli effetti del deterioramento per effetto di congelamenti e scongelamenti ripetuti, si raccomanda di aliquotare i campioni e poi congelarli. Evitare la conservazione in freezer frost-free.

Il siero dovrebbe essere separato dalle cellule quando conservato o spedito.

La presenza nel campione di particelle o aggregati può causare risultati falso positivi o scarsamente ripetibili. Centrifugare i campioni contenenti particelle prima del test.

Per questo test usare solo siero umano intero. La diluizione dei campioni qualcosa di diverso da siero umano, che non contiene anticorpi anti-HLA, può falsare i risultati.

Campioni battericamente contaminati, emolizzati, lipemici, itterici, o inattivati al calore possono portare a risultati errati.

PROCEDURA

Materiali Forniti:

I flaconi possono contenere più reagente di quanto descritto sull'etichetta. Misurare i reagenti con pipette appropriate quando si preparano le diluizioni.

1. 12 – 1 x 8 microstrip piccolo volume con supporto rivestiti di anticorpo monoclonale anti glicoproteine HLA classe I con linea colorata blue.
2. 12 – 1 x 8 microstrip piccolo volume con supporto rivestiti di anticorpo monoclonale anti glicoproteine HLA classe II con linea colorata viola
3. 1 x 125 mL Soluzione di Lavaggio concentrata
4. 1 x 14 mL Diluente Campioni
5. 1 x 14 mL Tampone Substrato
6. 1 x 14 mL Soluzione Stoppante
7. 1 x 120 µL Coniugato umano Anti-IgG
8. 1 x 14 mL Diluente lisante e coniugato
9. 1 x 2.5 mL Tampone di lisi dei linfociti
10. 1 x 14 µL Reagente controllo lisato classe I
11. 1 x 14 µL Reagente controllo lisato classe II
12. 1 x pellet, Linfociti di Controllo disidratati
13. 6 x 50 mg Substrato PNPP
14. 1 x 200 µL Siero Controllo Positivo
15. 1 x 200 µL Siero Controllo Negativo
16. 18 Copripiastre

Ulteriori Materiali Richiesti:

1. Provette per campioni, controlli e diluizioni
2. Pipette
3. Micropipette graduate per dispensare 1-10 µl, 10 – 100 µL e 100 – 1,000 µL e pipette
4. Timer
5. Lettore per micropiastre per la lettura delle DO a 405 o 410
6. Acqua deionizzata o distillata
7. Carta assorbente
8. Lavatore per micropiastre
9. Centrifuga
10. 37°C bagno-maria o incubatore
11. Media per cultura cellulare (RPMI)
12. Soluzione separazione linfociti in gradiente (1.077 g/mL)
13. Ghiaccio

Questa metodica è divisa in tre parti: “Preparazione dei linfociti di controllo disidratati”, “Preparazione del lisato Donatore”, e “procedura del Test”. Consigli utili:

1. Il lisato del controllo e del donatore può essere preparato anticipatamente, aliquotato e conservato da -70°C a -80°C. Se questi lisati sono stati precedentemente preparati, andare alla metodica.
2. Per ogni lisato donatore usato nel test includere un controllo negativo ed un controllo lisato.
3. Includere in ogni seduta il controllo reagente (siero di controllo positivo). Questo controllo deve essere incluso in ogni seduta di Classe I e Classe II.
4. Per ridurre gli effetti distruttivi delle protease sulle glicoproteine HLA, il lisato dei linfociti può essere posto su ghiaccio per un breve periodo di tempo non superiore a 4 ore.
5. Congelare i residui di lisato di controllo dei linfociti dividendoli in piccole aliquote (singolo uso) in provette chiuse ed etichettate a -70°C a -80°C per massimo 2 anni.
6. La velocità di centrifugazione è critica, non variare le velocità indicate.

Preparazione dei linfociti disidratati di controllo del lisato:

1. Reidratazione dei linfociti di controllo:
 - a) Reidratare i linfociti di controllo pellet (DLC) aggiungendo 500 µl di RPMI al pellet di linfociti
 - b) Incubare a temperatura ambiente per 1 ora.
 - c) Sciogliere il bottone di cellule con l'aiuto di una pipetta e agitare al vortex per ottenere una sospensione uniforme.
 - d) Centrifugare la miscela a 1.000 – 1.500 rcf per 5 minuti per impaccare le cellule.
 - e) Lasciare il surnatante fino a che le cellule non vengono lisate.

2. Lisi dei linfociti disidratati di controllo.

- a) Preparare 0.5 mL di tampone di lisi aggiungendo 50 μ L di tampone di lisi a 450 μ L di acqua deionizzata o distillata. Conservare il tampone di lisi diluito su ghiaccio per un tempo non superiore alle 4 ore.

NOTA: Il tampone di lisi é viscosa, pipettare 2-3 volte il tampone, dispensare nell'acqua distillata e lavare il puntale pipettando 2-3 volte. Miscelare bene.

- b) Rimuovere il surnatante dai linfociti di controllo riidratati (DLC).
- c) I linfociti di controllo reidratati (DLC) dovrebbero essere lisati in 500 μ L di tampone di lisi diluito. Miscelare con l'aiuto di una pipetta e vortexando fino alla completa risospensione delle cellule. Centrifugare la miscela a 1.000-1.500 rcf per 3 – 5 minuti per eliminare le membrane cellulari. Trasferire il surnatante in una provetta pulita.
- d) Il lisato dei linfociti di controllo dovrebbe essere posto su ghiaccio fino alle esecuzione del test (non superare le 4 ore). Il lisato dei linfociti di controllo può essere conservato a -70°C a -80°C per usi successivi.

Preparazione lisato Donatore:

1. Calcolare la quantità di cellule da preparare

- a) Assegnare il pozzetto di ogni siero da testare usando il foglio di lavoro fornito.
- b) Completare il primo calcolo per determinare il volume di *lisato diluito* necessario così come descritto nel foglio di calcolo del Lisato.
- c) Completare il secondo calcolo per determinare il volume di *lisato indiluito* necessario per gli strip di classe I.
- d) Completare il terzo calcolo per determinare il volume di *lisato indiluito* necessario per gli strip di classe II.
- e) Per il quarto calcolo, aggiungere il volume del lisato di classe I al volume del lisato di classe II per ottenere il volume totale di lisato indiluito richiesto.
- f) Usare l'ultimo calcolo per determinare il volume di cellule da preparare.
- g) Registrare tutte le diluizioni e calcoli sul foglio di lavoro.

2. Isolamento delle cellule donatore

I linfociti possono essere prelevati da sangue intero o milza e devono essere usati entro 72 ore dal prelievo.
Sangue intero:

- a.) stratificare su gradiente di separazione dei linfociti (1.077 g/mL) e centrifugare a 1.000-1.500 rcf per 20 minuti. Raccogliere l'anello di cellule separate, cercare di raccogliere le cellule il più possibile prive di globuli rossi. Se le cellule non sono usate per la ricerca di anticorpi di classe II si possono raccogliere anche le piastrine presenti sotto l'anello di linfociti.
- b.) Trasferire le cellule in una provetta grande e centrifugare a 1.000-1.500 rcf per 5-10 minuti per impaccare le cellule. Rimuovere il surnatante.
- c.) Aggiungere un quantità pari a cinque volte il volume delle cellule di RPMI e risospendere delicatamente.
- d.) Centrifugare e rimuovere il surnatante (primo lavaggio).
- e.) Ripetere c) e d) per un totale di 3 lavaggi.
- f.) Dopo l'ultimo lavaggio lasciare il surnatante fino alla lisi delle cellule.

Milza:

- a) Macerare la milza rompendo il tessuto in piccoli pezzi, sospendere in RPMI, stratificare in gradiente di separazione dei linfociti (1.077 g/mL) e centrifugare a 1.000-1500 rcf per 15-20 minuti. Raccogliere l'anello di cellule.
- b) Trasferire la sospensione in una provetta grande e centrifugare a 1.000-1.500 rcf per 5-10 minuti per impaccare le cellule. Rimuovere il surnatante.
- c) Aggiungere una quantità pari a cinque volte il volume delle cellule di RPMI e risospendere delicatamente.
- d) Centrifugare e rimuovere il surnatante (primo lavaggio)
- e) Ripetere c) e d) per un totale di 3 lavaggi.
- f) Dopo l'ultimo lavaggio lasciare il surnatante fino alla lisi delle cellule.

3. Lisi cellule Donatore

- a) Ogni 100 µl di linfociti impaccati preparare 1 ml di lisante diluito aggiungendo 100 µl di tampone di lisi a 900 µl di acqua distillata. Conservare il tampone di lisi diluito su ghiaccio fino a 4 ore.

NOTA: Il tampone di lisi é viscosa, pipettare 2-3 volte il tampone, dispensare nell'acqua distillata e lavare il puntale pipettando 2-3 volte. Miscelare bene.

- b) trasferire il volume di cellule donatore richiesto usando uno dei seguenti metodi:

- i) • Rimuovere il surnatante dalle cellule lavate.
• Il volume delle cellule può essere verificato aggiungendo un ugual volume di acqua alla provetta e misurare il volume di acqua.
• Aggiungere un volume uguale di RPMI al bottone di cellule per avere una sospensione al 50%.
• Miscelare bene e trasferire in una provetta il doppio del volume delle cellule necessarie (calcolate al punto 1).
• Centrifugare la sospensione a 1.000-1.500 rcf per 5-10 minuti per impaccare le cellule e ottenere il volume di linfociti necessario.
• Rimuovere il surnatante.

- c) Ogni 10 µl di cellule donatore o cellule del controllo dei linfociti (DLC) (~30 x 10⁶ cells) aggiungere 100 µl di lisante diluito. Miscelare bene con l'aiuto di una pipetta e con il vortex fino a completa risospensione delle cellule. Centrifugare la miscela a 1.000-1.500 rcf per 3-5 minuti per sedimentare le membrane cellulari. Trasferire il surnatante in una provetta pulita.

- ii) contare i linfociti e trasferire (usando la seguente tavola come guida) il numero appropriato di cellule in una provetta. Centrifugare a 1.000-1500 rcf per 5 minuti, rimuovere il surnatante.

Volume di linfociti impaccati	Stima # dei linfociti ottenuti da sangue periferico	Stima # dei linfociti ottenuti da milza
10 µL	30 x 10 ⁶ cellule	30 x 10 ⁶ cellule
20 µL	50 x 10 ⁶ cellule	60 x 10 ⁶ cellule

Se si usa lisato congelato, scongelare, aliquotare prima dell'uso e diluire come descritto nello step 4 della Procedura (vedi sotto).

Per lo strip di Classe I, sono necessari 2 µL di lisato indiluito o 6 x 10⁵ di cellule lisate per pozzetto.

Per lo strip di Classe II, sono necessari 4 µL di lisato indiluito o 12 x 10⁵ di cellule lisate per pozzetto.

Metodica

1. Portare i reagenti a temperatura ambiente (22-25°C).
2. Preparare la soluzione di lavaggio (TCW). Diluire 1 volume di soluzione concentra in 9 volumi di acqua deionizzata o distillata. Miscelare bene.
3. Calcolare il numero di pazienti da testare.
4. Diluire una quantità sufficiente di linfociti di controllo e di lisato donatori con il diluente del lisato e coniugato (LCD) in accordo con i calcoli eseguiti come segue:
 - a. Identificare una provetta "Lisato Donatore Classe I". Preparare il volume di lisato appropriato per gli strip di classe I diluendo 1 parte di lisato con 7 parti di Diluente del Lisato e Coniugato (**LCD**).
 - b. Identificare una provetta "Lisato Donatore Classe II". Preparare il volume di lisato appropriato per gli strip di classe II diluendo 1 parte di lisato con 3 parti di diluente del Lisato e Coniugato (**LCD**).
 - c. Identificare una terza provetta "Linfociti di Controllo". Preparare il volume di lisato linfociti di controllo appropriato diluendo 1 parte di lisato linfociti di controllo con 3 parti di diluente del Lisato e Coniugato diluente (**LCD**). Nota: la diluizione per I linfociti di controllo disidratati è la stessa per gli strip di classe I e la classe II, questo controllo dovrebbe essere usato nei pozzetti destinati al controllo dei reagenti in entrambi gli strip.

5. Rimuovere il numero di strip (MS1 o MS2) necessari dalla busta. Rimuoverli velocemente e sigillare gli strip non usati nella busta protettiva.

NOTA: Per ogni kit sono forniti solo due supporti per strip. Non gettarli fino a che tutti gli strip sono stati utilizzati.

NOTA: Orientare il supporto con la posizione A1 in alto e a sinistra. Assicurarsi che ogni strip sia ben alloggiata nel supporto. Segnare o numerare ogni strips per evitare errori. Mantenere lo stesso orientamento della piastra per l'intera seduta.

6. Dispensare 15 µl di lisato dei linfociti di controllo diluito nei pozzetti designati Controllo Reagente degli strip di classe I e II.
7. Dispensare 15 µl di lisato donatore di classe I e II nei pozzetti destinati ai pazienti, al controllo negativo e al controllo lisato rispettivamente nei pozzetti degli strip di classe I (blue) e classe II (viola).

NOTA: Se si testa più di un campione nella stessa seduta, IDENTIFICARE OGNI STRIP PER EVITARE ERRORI.

NOTA: Non aggiungere lisato, campioni o reagenti nei pozzetti del bianco. Assicurarsi di dispensare il lisato di classe I nello strip blue e quello di classe II nello strip viola. Aggiungere reagenti sbagliati può portare al fallimento del test.

8. Coprire la piastra ed incubare per 30 minuti 37°C a bagno-maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.

PREPARARE CAMPIONI E CONTROLLI

9. Diluire il siero di controllo Positivo (PC), il siero di controllo Negativo (NC) e il siero paziente nel Diluente Campione (SD) come segue e miscelare bene.

	Volume Diluente Campione	Volume Campione
PC	60 µL	20 µL
NC (per lisato donatore)	60 µL	20 µL
Campione Paziente (per lisato donatore)	60 µL	20 µL

NOTA: questo fornisce campione sufficiente per due pozzetti di classe I e due pozzetti di classe II. Centrifugare il siero paziente ad alta velocità in una microcentrifuga per 5-10 minuti. Rimuovere il surnatante da usare.

10. LAVAGGIO:

- Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- Aggiungere 140 µL di soluzione di lavaggio.
- Aspirare o decantare.
- Ripetere i punti b + c per un totale di 3 lavaggi.
- Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

11. Usando il foglio di lavoro come guida, aggiungere il campione paziente diluito e il controllo reagenti nei pozzetti corrispondenti come segue:

- Dispensare 15 µl di siero di controllo positivo ai pozzetti Controllo Reagente di entrambi gli strip contenenti il lisato dei linfociti di controllo.
- Dispensare 15 µl di siero di controllo negativo diluito ai pozzetti corrispondenti.
- Dispensare 15 µl di diluente del lisato e del coniugato nei pozzetti del controllo lisato dello strip di classe I e II per evitare l'essiccamento durante le incubazioni.
- Dispensare 15 µl dei sieri pazienti diluiti nei pozzetti contenenti il lisato donatori.

12. Coprire la piastra ed incubare per 30 minuti 37°C a bagno-maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.

NOTA: durante l'incubazione eseguire i seguenti passaggi.

13. Del Lisato e Coniugato (**LCD**). Usare un contenitore di polipropilene. Diluire 1 parte di Coniugato (**AG**) con 100 parti di diluente

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

NOTA: il coniugato è viscoso. Pipettare 2-3 volte ne flaconcino e lavare bene il puntale pipettando 2-3 volte nel diluente. Miscelare bene.

14. Diluire il reagente controllo del lisato (LCRI e LCRII) nel diluente del lisato e coniugato (LCD) come segue:

LCRI o LCRII	2 µL
LCD	198 µL

Miscelare bene.

NOTA: è importante diluire con precisione l'LCR per ottenere valori del controllo lisato accettabili.

15. LAVAGGIO:

- Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- Aggiungere 140 µL di soluzione di lavaggio.
- Aspirare o decantare.
- Ripetere i punti b + c per un totale di 3 lavaggi.
- Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

NOTA: È importante rimuovere ogni residuo di soluzione dopo il lavaggio finale.

16. Dispensare 15 µl reagente di controllo del lisato nei pozzetti controllo del lisato corrispondenti:

- dispensare l'LCR1 diluito nei pozzetti dello strip di classe I (blue)
- dispensare l'LCR2 diluito nei pozzetti dello strip di classe II (viola)

17. Dispensare 15 µl di coniugato diluito (preparato come al punto precedente) a tutti i restanti pozzetti tranne i pozzetti del controllo lisato e del bianco.

18. Coprire la piastra ed incubare per 30 minuti a 37°C a bagno-maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.

NOTA: durante l'incubazione eseguire i seguenti step

19. Sciogliere il PNPP (**PN**) in polvere aggiungendo nel flacone 0.5 mL di acqua deionizzata o distillata. Chiudere e miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.

20. Diluire il PNPP (PN) con il tampone Substrato (SB) come segue:

Strips:	4 – 1x8	24 – 1x8
PN	20 µL	120 µL
SB	2 mL	12 mL

Miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso. Può essere conservato fino a 45 minuti a temperatura ambiente (22 - 25°C) prima dell'uso.

21. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 140 µL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 lavaggi.
- e) Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

Passare velocemente agli step successivi.

22. Dispensare 50 µL PNPP diluito a tutti i pozzetti ad eccezione dei pozzetti destinati al BIANCO.

23. Incubare gli strip per 30 minuti a TEMPERATURA AMBIENTE (22 – 25°C) al buio.

NOTA: Tempi e temperatura di questa incubazione sono critici. NON variare i tempi e le temperature stabilite. Fare partire il tempo di incubazione al momento della dispensazione del PNPP al primo pozzetto.

24. Stappare la reazione dispensando 50 µL di soluzione stoppante ad ogni pozzetto nella stessa sequenza in cui si è aggiunto il substrato. Dispensare 100 µL di soluzione stoppante ai pozzetti del bianco.

25. Leggere le assorbanze (DO) di ogni pozzetto a 405 o 410 nm. Se i risultati non possono essere letti immediatamente, riportare gli strip al buio per 30 minuti al massimo.

NOTA: non usare un filtro di riferimento quando si usa un lettore per micropiastre.

26. Sottrarre i valori del bianco ad ogni valore dei campioni e dei controlli. Molti lettori ELISA sono programmati per sottrarli automaticamente.

27. Registrare i risultati sulla Recording Sheet.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il controllo di qualità MICROAMS® è incluso in ogni kit grazie alla presenza dei sieri di controllo negativo e positivo e i reagenti di controllo del Lisato. Questi controlli dovrebbero essere inclusi in ogni esecuzione del test per aiutare a determinare la presenza di errori tecnici o non reattività dei reagenti.

Criteri di validazione dei test:

	Controllo Negativo (NC)	Controllo Positivo (PC)
Mean OD	≤ 0.300	≥ 1.000

I pozzetti dei reagenti di controllo del Lisato devono mostrare una reazione positiva (>2x il valore della media dei controlli negativi). Una reazione positiva nei pozzetti del controllo del lisato indica che in quei pozzetti sono legate glicoproteine HLA. Questo controllo non identifica necessariamente un'preparazione o diluizione impropria del lisato, né assicura una adeguata reattività sierologica delle glicoproteine.

In uno studio con 35 diversi lisati di derivazione splenica il risultato tipico per il controllo del lisato di classe I ha un range di DO di 1.255 – 3.049 con una media di DO di 2.124 e per il controllo del lisato di classe II ha un range di DO di 0.766 – 2.366 con una media di DO di 1.808.

I valori di DO per campioni pazienti positivi testati in doppio devono cadere entro 20% della loro media. Campioni i cui risultati sono al di fuori di tale limite devono essere ritestati.

NOTA: Valori dei duplicati scorretti possono essere ottenuti a causa di omissione dei reagenti o dei campioni, ineguale aggiunta o miscelazione dei reagenti, inadeguate tecniche di lavaggio, temperature di incubazione ineguali, non

allineamento del lettore, esposizione alla luce durante l'incubazione finale, o cross contaminazione dei pozzetti. Il fallimento del test in doppio può portare ad accettare risultati sbagliati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati con valori di DO uguali o superiori a il valore ottenuto dalla media dei controlli negative X2 sono considerati positivi.

LIMITAZIONI

Risultati errati possono avvenire per contaminazione batterica dei componenti del kit, incubazione inadeguata, lavaggi inadeguati, esposizione alla luce del substrato, omissione dei reagenti, esposizione a temperature più elevate o inferiori a quelle indicate, (piastrine insufficienti o eccessive) o omissione di step di lavoro.

La presenza di immunocomplessi o aggregati immunoglobulinici nel paziente può causare un aumento di legami non specifici e produrre risultati falsamente positivi.

I risultati di questo test non dovrebbero essere usati come unica base per una decisione clinica.

Alcuni anticorpi a basso titolo o bassa avidità potrebbero non essere determinati da questo test.

Questo test determina solo anticorpi di classe IgG.

Le caratteristiche di esecuzione di questo prodotto sono state stabilite usando sieri contenenti anticorpi anti-HLA noti per i loci A, B e DR.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST

Per assicurare la reattività e specificità, ogni lotto di MICROAMS[®]: HLA Classe I e Classe II è testato prima di essere messo in commercio con campioni noti per contenere anticorpi anti-HLA donatore specifici.

Valutazione del Test

Il MICROAMS[®] è stato testato contro il kit GTI Antibody Monitoring System (AMS[®]) in uno studio comparativo. Sono stati valutati 100 campioni sia con il MicroAMS[®] e AMS[®] per la reattività HLA di Classe I e 100 campioni per la reattività HLA di Classe II.

		AMS [®] Class I		Totale
		Positivo	Negativo	
MICROAMS [®] Class I	Positivo	52	0	52
	Negativo	0	49	49
	Totale	52	49	101

Concordanza: 100%

Metodo di Confronto: GTI Antibody Monitoring System: HLA Classe I e Classe II (AMS[®]1+2)

Classe I	Co-positività / Sensitività	Co-negatività/ Specificità
Valore	100%	100%
95% concordanza (bassa)	93.1%	92.7%
95% concordanza (alta)	100%	100%

		AMS [®] Class II		Totale
		Positivo	Negativo	
MICROAMS [®] Class II	Positivo	49	0	49
	Negativo	0	52	52
	Totale	49	52	101

Concordanza: 100%

Metodo di Confronto: GTI Antibody Monitoring System: HLA Classe I e Classe II (AMS[®]1+2)

Classe II	Co-positività / Sensitività	Co-negatività/ Specificità
Valore	100%	100%
95% concordanza (bassa)	92.7%	93.1%
95% concordanza (alta)	100%	100%

Precisione

Sono stati condotti studi anche per valutare la precisione inter e intra test del MICROAMS®. In ogni caso 2 campioni positivi noti e 2 campioni negativi noti sono stati testati contro 2 differenti lisati.

La valutazione dei dati è stata eseguita in accordo con il protocollo NCCLS per la valutazione della performance di Test Qualitativi: linea guida Approvata EP12-A. I dati dimostrano il 100% concordanza intra-test (n=20), 100% concordanza tra diverse esecuzioni del test (n=40) e 100% concordanza tra lotto e lotto (3 lotti n=24) nei risultati ottenuti e riportati.

REFERENZE

1. Marsh SGE, Parham P, Barber LD, The HLA Facts Book. Academic Press 2000:84-91.
2. Rodey Glenn E. HLA Beyond Tears. De Novo, Inc. 2000; 213.
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. Karuppan 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, Ultenbogaart CH, Fine RN. Role of antibodies to B lymphocytes in renal transplantation. Transplant Proc 1977 Mar;9 (1): 751-753.
6. Scronik JC, LeFor 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 1992; S4 (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.™

MICROAMS®
Micro-Antibody Monitoring System

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

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



REF

M-AMS

Rev. 2007-10-22 (I)



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

www.gtidiagnostics.com