

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

PROPÓSITO DE EMPLEO

MICROAMS® es un ensayo cualitativo en fase sólida inmuno-enzimático (ELISA) diseñado para detectar anticuerpos IgG contra antígenos específicos del donante de HLA de Clase I y Clase II.

Para Uso en Diagnóstico *In Vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El sistema HLA es el sistema antigénico principal en la determinación de la supervivencia de los alo-transplantes y de la transfusión de plaquetas en individuos sensibilizados.¹ Los anticuerpos HLA pueden ser adquiridos por alo-inmunización como resultado de un embarazo, una transfusión de productos sanguíneos o un trasplante previo. En general, la alo-inmunización da lugar a una producción de anticuerpos anti HLA en un 33% de los individuos expuestos.² Las moléculas HLA de clase I y de clase II son glicoproteínas de membrana polimórficas. La presencia de anticuerpos contra antígenos HLA se ha demostrado que indican un posible fallo del trasplante.³⁻⁶ La monitorización de estos anticuerpos post-trasplante es muy importante para poder conocer el potencial de supervivencia del injerto.^{7,8}

PRINCIPIO

Las glicoproteínas HLA se preparan a partir de linfocitos del donante solubilizando las células con un detergente no iónico. Una vez solubilizados, los lisados de los linfocitos se añaden a los pocillos en los que están inmovilizados los anticuerpos monoclonales específicos anti HLA de clase I o de clase II. Las glicoproteínas HLA se unirán al anticuerpo monoclonal, las glicoproteínas no unidas se eliminarán mediante lavados. Los pocillos que tengan glicoproteínas unidas se testarán con sueros humanos para detectar anticuerpos contra moléculas HLA. Los anticuerpos no unidos se eliminarán mediante lavados. Se añadirá a los pocillos un reactivo anti globulina humana (Anti-IgG) marcada con fosfatasa alcalina y se incubará. La Anti-IgG no unida se eliminará mediante lavados y se añadirá el sustrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Después de una incubación de 30 minutos se parará la reacción con una solución de hidróxido sódico. La densidad óptica del color que se haya desarrollado se medirá mediante un espectrofotómetro.

Este kit utiliza tres sistemas de control:

El primer sistema está compuesto por unos linfocitos deshidratados (Control de linfocitos deshidratados) y un anticuerpo (Suero control positivo) que se sabe que reacciona con glicoproteínas de Clase I y de Clase II de los linfocitos. Los linfocitos deshidratados se rehidratan y se solubilizan para obtener un lisado. El lisado se dispensa a los pocillos control de reactivo. El Suero Control Positivo se testa contra el control de lisado para confirmar que el Tampón de Lisis de Linfocitos y el resto de reactivos funcionan correctamente.

El segundo sistema de control está compuesto por dos anticuerpos monoclonales conjugados con fosfatasa alcalina. Uno (el reactivo Control de Lisado de Clase I) reacciona contra las glicoproteínas HLA de Clase I. El otro (el reactivo Control de Lisado de Clase II) reacciona contra las glicoproteínas HLA de Clase II. Cuando se testa contra las glicoproteínas capturadas en el pocillo, este reactivo da resultados positivos demostrando que las moléculas HLA de Clase I o de Clase II se han unido en los pocillos.

El tercer sistema de control es el control negativo. Las reacciones positivas vienen indicadas por aquellos pocillos que den un valor superior al doble (2x) del valor medio de los pocillos designados con el control negativo.

REACTIVOS

Número máximo de test por kit: 44

Los reactivos deben conservarse según las instrucciones de la etiqueta.

- | | | |
|------------|----|---|
| MS1 | 1. | Microcubetas: De bajo volumen, tiras de microcubetas de fondo plano en las que se ha inmovilizado anticuerpos monoclonales específicos para HLA Clase I (código color azul) y HLA Clase II (código color púrpura). Las tiras de las microcubetas están dentro de la bolsa embalaje. Listo para el uso. |
| MS2 | 2. | |
| TCW | 3. | Solución Concentrada de Lavado (10x): Solución tamponada de Tris (hidroximetil) aminometano conteniendo cloruro sódico y Tween 20. 1% azida sódica. Diluir con agua desionizada o destilada antes del uso. Almacenar la solución de trabajo de Lavado hasta 48 horas a temperatura ambiente o hasta siete días entre 2 y 8°C. |

- | | |
|--------------|--|
| SD | 4. Diluyente de Muestra: Solución salina tamponada de Fosfato con albúmina bovina y suero de ratón. 0.1% azida sódica. Lista para el uso. |
| SB | 5. Tampón Substrato: Esta solución contiene dietanolamina y cloruro magnésico. 0.02% azida sódica. Listo para el uso. Proteger de la luz. |
| SS | 6. Solución de Paro: Hidróxido Sódico 3 M. Listo par el uso. Manipular con cuidado. |
| AG | 7. Conjugado (100x): Anticuerpo de cabra anti Inmunoglobulina G Humana purificado por afinidad conjugado con Fosfatasa Alcalina (IgG). 0.1% azida sódica. (Código color tapón blanco). Diluir con Diluyente de lisado y conjugado antes del uso. |
| LCD | 8. Diluyente de lisado y conjugado: Solución tampón Tris que contiene cloruro sódico. 0,1% azida sódica (código color tapón azul). Listo para usar. |
| LLB | 9. Tampón lisis linfocitos (10x): Tampón Tris salino que contiene un detergente no-iónico y 0.5% de azida sódica. Se debe diluir en agua destilada o desionizada antes de usar. |
| LCRI | 10. Reactivo Control de lisado de Clase I (LCRI) (100x): Anticuerpo de ratón anti Inmunoglobulina G Humana (IgG) conjugado con fosfatasa alcalina y específico para glicoproteína HLA de Clase I. 0,1% azida sódica. (Código color tapón azul.) Se debe diluir en diluyente de lisado y conjugado antes de usar. |
| LCRII | 11. Reactivo Control de lisado de Clase II (LCRII) (100x): Anticuerpo de ratón anti Inmunoglobulina G Humana (IgG) conjugado con fosfatasa alcalina y específico para glicoproteína HLA de Clase II. 0,1% azida sódica. (Código color tapón púrpura.) Se debe diluir en diluyente de lisado y conjugado antes de usar. |
| DLC | 12. Control linfocitos deshidratados precipitados: Linfocitos deshidratados. Preparar como se indica. |
| PN | 13. PNPP (p-nitrofenil fosfato) Substrato: Polvo Cristalino. Reconstituir con agua desionizada o destilada y diluir en tampón de Substrato antes del uso. Proteger de la luz. |
| PC | 14. Suero Control Positivo (4x): Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar. |
| NC | 15. Suero Control Negativo (4x): Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar. |
| PS | 16. Tapas para placas. |

PRECAUCIONES

- No utilizar reactivos turbios o contaminados.
- No usar reactivos después de su fecha de caducidad.
- La sustitución de los componentes suministrados en el kit por cualquier otro puede provocar resultados erróneos o inconsistentes, sin embargo cualquier lote de Tampón de Lisis de GTI para Linfocitos puede ser usado para hacer lisados.
- Las microcubetas y los reactivos contenidos en el kit no pueden usarse en otros kits de otros sistemas.
- Seguir las instrucciones del fabricante de las pipetas en cuanto a aspiración y dispensación para la preparación correcta de las diluciones.
- Se deben usar pipetas correctamente calibradas para la adición de reactivos.
- Los agregados de linfocitos antes de realizar el lisado pueden dar lugar a preparaciones de baja calidad, esto provocaría resultados bajos cuando se testaran con el Reactivo Control de Lisado. Es importante tratar las células suavemente para evitar agregaciones. Contaminaciones de las preparaciones de linfocitos con eritrocitos pueden hacer disminuir la cantidad de glicoproteínas HLA en el lisado si no son eliminados antes de realizar la estimación de volumen celular.
- Las centrifugaciones a velocidades superiores a las recomendadas pueden dar lugar a una lisis anticipada, así como agregados celulares y pérdida de linfocitos.

- Los lisados se deben almacenar congelados a -70 hasta -80°C antes de su uso. Los lisados no se deben volver a congelar una vez descongelados.
- SE DEBE tener cuidado de evitar la contaminación del diluyente de lisado y conjugado, LCRI, LCRII, y del Conjugado. La contaminación inadvertida de estos reactivos con suero humano provocaría la neutralización del Conjugado o de los reactivos LCRI y LCRII y el fallo de la prueba.
- Después de cada serie de análisis desechar los restos no utilizados de Conjugado diluido, Tampón de lisis de linfocitos diluido, Reactivo control del Lisado diluido, Controles positivo y negativo diluidos, y reactivo PNPP diluido y reconstituido.
- La reacción Enzima sustrato de la última incubación es sensible a la temperatura y debería realizarse entre 22 y 25°C.
- Puede ser necesario que el laboratorio establezca tiempos de incubación más largos o más cortos, debido a las variaciones en instrumentos o en la temperatura de la habitación para obtener resultados de controles consistentemente válidos. Debido a que la temperatura de la incubación final puede afectar a los valores de los controles, es importante monitorizar periódicamente la temperatura de la habitación.
- Debido al pequeño tamaño de las microcubetas de bajo volumen, es esencial que el lector de placas sea chequeado para una correcta alineación.
- No se debe usar una longitud de honda de referencia cuando se lea la placa en un lector de placas.

CUIDADO

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

TOMA DE MUESTRA

Células: El bazo se debe recolectar siguiendo los protocolos de recogida locales. El bazo debe ser procesado dentro de las 72 horas siguientes a su extracción. Los linfocitos de sangre periférica se deben recoger en tubos con heparina sódica o con ACD, mediante técnicas asépticas y se procesaran dentro de las 72 horas siguientes a su extracción.

Suero: La sangre se recogerá sin anticoagulante (suero) siguiendo una técnica aséptica y se testará mientras sea fresco para minimizar el riesgo de obtener falsos positivos o falsos negativos debido a un almacenamiento inapropiado o bien a una contaminación de la muestra.

Las muestras de suero que no puedan analizarse de forma inmediata deberían almacenarse a 2-8°C por no más de 48 horas o congelarlas. Las muestras congeladas a -20°C o inferior, permanecen en buenas condiciones por varios años (2 años). De todas formas, para evitar el efecto nocivo de repetidos ciclos descongelación/congelación, se recomienda alicuotar las muestras en pequeños volúmenes y conservarlas congeladas. Evitar el almacenamiento en un congelador antiestancia.

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

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

Para este test sólo puede usarse suero humano completo. La dilución previa de las muestras en cualquier otra cosa diferente a suero humano, que no contenga anticuerpos contra glicoproteínas HLA, podría afectar al resultado.

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

PROCEDIMIENTO

Materiales Suministrados:

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

1. 12 – 1 x 8 tiras de bajo volumen con una banda azul que contienen anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas HLA de clase I inmovilizados, con marco.
2. 12 – 1 x 8 tiras de bajo volumen con una banda púrpura que contienen anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas HLA de clase II inmovilizados, con marco.
3. 1 x 125 mL Solución de Lavado concentrada
4. 1 x 14 mL Diluyente de Muestra
5. 1 x 14 mL Tampón Substrato
6. 1 x 14 mL Solución de Paro
7. 1 x 120 µL Conjugado Anti-IgG Humana
8. 1 x 14 mL Diluyente de lisado y conjugado
9. 1 x 2.5 mL Tampón lisis linfocitos
10. 1 x 14 µL Reactivo Control de lisado Clase I
11. 1 x 14 µL Reactivo Control de lisado Clase II
12. 1 x precipitado, Control Precipitado de Linfocitos Deshidratados
13. 6 x 50 mg PNPP Substrato
14. 1 x 200 µL Suero Control Positivo
15. 1 x 200 µL Suero Control Negativo
16. 18 Tapas para Placas

Material Necesario Adicionalmente:

1. Tubos para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos
2. Pipetas de transferencia
3. Micropipetas ajustables para dispensar 1-10 µl, 10 – 100 µL y 100 – 1,000 µL y puntas desechables
4. Cronómetro
5. Lector de microplacas capaz de medir DO a 405 o 410
6. Agua desionizada o destilada
7. Toallitas papel absorbente
8. Lavador de microplacas o similar
9. Centrifuga capaz de separar suero o plasma de las muestras de paciente
10. Baño de agua o incubador de 37°C
11. Medio cultivo celular
12. Medio de separación por densidad de linfocitos (1.077 g/mL)
13. Hielo

Este procedimiento está dividido en tres partes principales: ‘Preparación del Control de Lisado de los Linfocitos Deshidratados’, ‘Preparación del Lisado de Donante’ y ‘Procedimiento del test’. Indicaciones útiles:

1. El control de lisado y el lisado del donante se deben preparar con antelación, hacer alícuotas y congelarlas a -70 hasta -80°C. Si los lisados ya han sido preparados, pasar a ‘Procedimiento del Test’.
2. Para cada lisado de donante utilizado en el test, se debe incluir un Control Negativo y un Control de Lisado.
3. El Control de reactivo (Suero Control Positivo) se debe incluir en cada test Clase I y Clase II.
4. Para reducir los efectos negativos de las proteasas sobre las glicoproteínas HLA, los lisados de linfocitos se pueden mantener en hielo durante un corto período de tiempo no excediendo las 4 horas.
5. Rápidamente se debe congelar cualquier sobrante de lisado donante o control que no se haya diluido, en pequeñas alícuotas (de un solo uso) en tubos sellados y etiquetados, a -70° hasta -80°C y durante un período de tiempo no superior a 2 años.
6. Es sumamente importante (crítico) centrifugar a la velocidad recomendada (rcf). NO VARIAR dicha velocidad establecida.

Preparación del Lisado del Control de Linfocitos Deshidratados:

1. Rehidratar el control de linfocitos deshidratados.
 - a) Rehidratar el control de linfocitos deshidratados (**DLC**) añadiendo 500µL de medio de cultivo completo al botón celular (pellet) seco.
 - b) Dejarlo a temperatura ambiente por una hora.
 - c) Resuspender el botón celular (pellet) con la ayuda de una punta de pipeta y agitar hasta obtener una suspensión celular uniforme.
 - d) Centrifugar la mezcla a 1000-1500 rcf durante 5 minutos.
 - e) Dejar el sobrenadante en las células hasta que se deba realizar la lisis.

2. Lisis del Control de Linfocitos Deshidratados

- a) Preparar 0.5 mL de tampón de lisis diluido añadiendo 50 µL de Tampón de Lisis a 450 µL de agua destilada o desionizada. Mantener en hielo el tampón de lisis diluido durante un máximo de 4 horas.

NOTA: El tampón de lisis de linfocitos es viscoso. Llenar la punta de pipeta varias veces (2-3) en el tampón de lisis de linfocitos antes de dispensarlo y enjuagar después con agua destilada o desionizada. Mezclar bien.

- b) Descartar el sobrenadante del Control de Linfocitos Deshidratados (**DLC**) una vez hidratado.
- c) El Control de Linfocitos Deshidratados (**DLC**) hidratado de debe lisar en 500 µL de Tampón Lisis Linfocitos *diluido*. Mezclar bien con la ayuda de una punta de pipeta y utilizando el vortex para una completa resuspensión de las células. Centrifugar la mezcla a 1,000 - 1,500 rcf durante 3 - 5 minutos para sedimentar las membranas celulares. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y etiquetado.
- d) El Lisado de Control de Linfocitos Deshidratados se debe mantener en hielo hasta que sea usado en el test (no excediendo las 4 horas). El Lisado de Control de Linfocitos Deshidratado se puede almacenar a -70 hasta -80°C para un futuro uso.

Preparación del Lisado del Donante:

1. Cálculo de la cantidad de células a preparar

- a) Asignar una localización para cada muestra de suero que se deba testar utilizando las hojas de resultados incluidas.
- b) Completar el primer cálculo en la hoja de trabajo de Calculo del Lisado para determinar la cantidad de lisado *diluido* necesario.
- c) Completar el segundo cálculo para determinar el volumen de lisado *no diluido* necesario para las tiras de Clase I.
- d) Completar el tercer cálculo para determinar el volumen de lisado *no diluido* necesario para las tiras de Clase II.
- e) Para el cuarto cálculo, añadir el volumen de lisado de clase I al volumen de lisado de Clase II para obtener el volumen total de lisado no diluido necesario.
- f) Usar el último cálculo para determinar el volumen de células que se deben preparar.
- g) Anotar todas las diluciones y cálculos en la hoja de trabajo.

2. Aislamiento de las células del Donante

Los linfocitos se deben separar de la sangre total o del bazo. Tanto la sangre total como el bazo se deben procesar dentro de las 72 horas siguientes a la extracción.

Sangre Total:

- a) Si se usa sangre total, disponer la muestra en un medio apropiado para la recuperación de linfocitos en un gradiente de densidades (1.077 g/mL), centrifugando a 1.000 - 1.500 rcf durante 15 - 20 minutos. Recoger la banda de células de la interfase del medio de separación por densidad.
- b) Transferir la suspensión a un tubo grande y centrifugar a 1000-1500 rcf durante 5-10 minutos para obtener un botón celular (pellet). Eliminar el sobrenadante.
- c) Añadir medio de cultivo completo (como mínimo 5 veces el volumen del 'pellet'. Resuspender las células.
- d) Centrifugar para concentrar las células y eliminar el sobrenadante (primer lavado)
- e) repetir c) y d) hasta un total de 3 lavados.
- f) Después del lavado final dejar el sobrenadante con las células hasta que se vaya a realizar el lisado.

Bazo:

- a) Para obtener los linfocitos del bazo, macerar para romper el tejido en pequeñas partículas, resuspender en medio de cultivo completo, disponer en un medio de separación de linfocitos por gradiente de densidad (1.077 g/mL) y centrifugar a 1000 - 1.500 rcf durante 15 - 20 minutos. Recoger la banda de células en la interfase del medio.
- b) Transferir la suspensión a un tubo grande y centrifugar a 1000-1500 rcf durante 5-10 minutos para obtener un botón celular (pellet). Eliminar el sobrenadante.
- c) Añadir medio de cultivo completo (como mínimo 5 veces el volumen del 'pellet'. Resuspender las células.
- d) Centrifugar para concentrar las células y eliminar el sobrenadante (primer lavado)
- e) repetir c) y d) hasta un total de 3 lavados.
- f) Después del lavado final dejar el sobrenadante con las células hasta que se vaya a realizar el lisado.

3. Lisis de las Células Donantes

- a) Para cada 100 μL de linfocitos concentrados que se deban lisar, preparar 1.0 mL de tampón de lisis diluido añadiendo 100 μL de tampón de lisis a 900 μL de agua destilada o desionizada. Guardar el tampón de lisis diluido en baño de hielo durante un máximo de 4 horas.

NOTA: El tampón de lisis de linfocitos es viscoso. Llenar la punta de pipeta varias veces (2-3) en el tampón de lisis de linfocitos antes de dispensarlo y enjuagar después con agua destilada o desionizada. Mezclar bien.

- b) Transferir el volumen necesario de células del donante a un tubo de ensayo por alguno de los dos métodos siguientes:
- i)
 - Eliminar el sobrenadante del botón celular (pellet) de las células lavadas.
 - Añadir un volumen igual de medio de cultivo completo para obtener una suspensión celular al 50%.
 - El volumen de células concentradas se calcula añadiendo un volumen similar de agua en un tubo idéntico y midiendo ese volumen de agua.
 - Mezclar bien y transferir el doble del volumen de células requeridas (calculado en el paso 1 anterior) en un tubo de ensayo.
 - Centrifugar la suspensión celular a 1000-1500 rcf durante 5-10 minutos para obtener un botón celular (pellet) que contenga el volumen necesario de linfocitos.
 - Descartar el sobrenadante.
- c) Por cada 10 μL de células de donante ($\approx 30 \times 10^6$ cells) añadir 100 μL de Tampón de Lisis para Linfocitos *diluido*. Mezclar bien con la ayuda de una punta de pipeta y utilizando el vortex para una completa resuspensión de las células. Centrifugar la mezcla a 1,000 - 1,500 rcf durante 3 – 5 minutos para sedimentar las membranas celulares. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y etiquetado.
- ii) De forma alternativa, contar los linfocitos y transferir (usando la tabla siguiente) el apropiado número de células a un tubo de ensayo de polipropileno. Centrifugar a 1000-1500 rcf durante 5 minutos para obtener un botón celular (pellet) de linfocitos. Eliminar el sobrenadante.

Volumen de linfocitos concentrados	Estimado # linfocitos obtenido de sangre periférica	Estimado # linfocitos obtenido de células de bazo
10 μL	30×10^6 cells	30×10^6 cells
20 μL	50×10^6 cells	60×10^6 cells

Cuando se vayan a utilizar los lisados congelados, descongelar la alícuota justo antes de su uso y diluirla de forma apropiada según se describe en el Paso 4 del Procedimiento.

Para tiras de Clase I, 2 μL de lisado no diluido o 6×10^5 células lisadas son necesarias por pocillo.

Para tiras de Clase II, 4 μL de lisado no diluido o 12×10^5 células lisadas son necesarias por pocillo.

Procedimiento del Test

1. Atemperar los reactivos a temperatura ambiente (22 to 25°C).
2. Prepara la Solución de Lavado diluyendo el concentrado de lavado (**TCW**). Añadir 1 volumen de Concentrado de Lavado a 9 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
3. Determinar el número de muestras de paciente a analizar.
4. Diluir la cantidad apropiada de Lisado Control de Linfocitos deshidratados en el Diluyente de Lisado y Conjugado (**LCD**) siguiendo los cálculos de la hoja de trabajo como se detalla:
 - a) Rotular un tubo como ‘Lisado Donante Clase I’. Preparar una cantidad apropiada de lisado para las tiras de Clase I diluyendo 1 parte de lisado con 7 partes de Diluyente Lisado y Conjugado (**LCD**), en una proporción 1:7.
 - b) Rotular un segundo tubo como “Lisado Donante Clase II”. Preparar una cantidad apropiada de lisado para las tiras de Clase II diluyendo 1 parte de lisado con 3 partes de Diluyente Lisado y Conjugado (**LCD**), en una proporción 1:3.
 - c) Rotular un tercer tubo como “Control Linfocitos Deshidratados”. Preparar una cantidad apropiada de lisado de control diluyendo 1 parte de lisado de linfocitos deshidratados control con 3 partes de Diluyente Lisado y Conjugado (**LCD**), en una proporción 1:3. La dilución del control linfocitos deshidratados se utilizará para los dos tipos de tiras, las de Clase I y Clase II, debiéndose usar en los pocillos destinados para el control, en ambos casos.

- Sacar las tiras de microcubetas (MS1 o MS2) de la bolsa. Coger el número necesario de tiras MS1 y MS2. Rápidamente devolver a la bolsa protectora las tiras que no se vayan a utilizar.

NOTA: Con el kit sólo se suministran dos marcos. No desechar hasta haber utilizado todas las tiras.

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

- Añadir 15µL del Lisado de Control de Linfocitos Deshidratados diluido a los pocillos de Clase I y de Clase II designados como Control de Reactivo.
- Añadir 15µL de lisado del donante Clase I y Clase II diluido a todos los pocillos asignados a: paciente, Control Negativo y Control de lisado en cada una de las tiras Clase I (azul) y Clase II (púrpura).

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

NOTA: No añadir lisado, muestras o reactivos a los pocillos usados como 'blanco.' Se debe estar seguro de que los lisados diluidos de Clase I se añaden a las tiras azules y que los lisados diluidos de Clase II se añaden a las tiras púrpura. Añadir una dilución incorrecta puede dar lugar a errores en el ensayo.

- Sellar las microcubetas con una tapa para placas e incubar por 30 minutos en un baño de agua a 37°C. En caso de utilizar un incubador seco aumentar 10 minutos el tiempo de incubación.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES

- Diluir el Suero Control Positivo (**PC**), Suero Control Negativo (**NC**) y el suero del paciente en Diluyente de Muestra (**SD**) como se indica a continuación y mezclar bien.

	Volumen Diluyente de Muestra (SD)	Volumen Muestra
PC	60 µL	20 µL
NC (para el lisado del donante)	60 µL	20 µL
Muestra Paciente (para el lisado del donante)	60 µL	20 µL

NOTA: De esta manera se obtendrá suficiente muestra para testar dos pocillos de Clase I y dos pocillos de Clase II. Centrifugar el suero del paciente en una microcentrífuga a una alta velocidad durante 5 – 10 minutos. Recuperar el sobrenadante para su uso.

10. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
 - Añadir 140 µL de Solución de trabajo de Lavado.
 - Aspirar o decantar.
 - Repetir los pasos b + c para un total de 3 lavados.
 - Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.
- Usando la hoja de resultados como guía, añadir las muestras de los pacientes diluidas y los controles de reactivos a los pocillos asignados como sigue:
 - Añadir 15 µL del Suero Control Positivo diluido en el pocillo de Control de Reactivo de ambas tiras que ya contienen el Lisado de los linfocitos Control deshidratados.
 - Añadir 15 µL de Suero Control Negativo diluido a los pocillos Control Negativo.
 - Añadir 15 µL de Diluyente de Lisado y Conjugado a los pocillos Control de Lisado de las tiras de Clase I y de Clase II. Esto evitará que se sequen durante el periodo de incubación.
 - Añadir 15 µL de la muestra de suero del paciente diluida a los pocillos indicados que ya contienen el lisado del donante en las tiras de Clase I y de Clase II.

12. Sellar las microcubetas con una tapa para placas e incubar por 30 minutos en un baño de agua a 37°C. En caso de utilizar un incubador seco aumentar 10 minutos el tiempo de incubación.

NOTA: Durante los tiempos de incubación realizar los siguientes pasos:

13. Diluir 1 parte de Conjugado (**AG**) con 100 partes de Diluyente de Lisado y Conjugado (**LCD**). Utilizar un contenedor de polipropileno.

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

NOTA: El conjugado es viscoso. Llenar la punta de la pipeta varias veces con el Conjugado antes de dispensar y enjuagar después de añadirlo al Diluyente de Lisado y Conjugado. Mezclar bien.

14. Diluir el Reactivo de Control de Lisado (**LCRI** y **LCR2**) en el Diluyente de Lisado y Conjugado (**LCD**) como se indica:

LCRI y LCR2	2 µL
LCD	198 µL

Mezclar bien.

NOTA: Es muy importante ser preciso al tomar los volúmenes de los reactivos LCR ya que de esto dependerá tener unos valores de Control del lisado aceptables.

15. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 140 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para un total de 3 lavados.
- Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

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

16. Añadir 15 µL del Reactivo Control de Lisado diluido a cada uno de los pocillos de Control de Lisado:

- Añadir LCRI diluido a las tiras de Clase I (azul)
- Añadir LCR2 diluido a las tiras de Clase II (púrpura)

17. Añadir 15 µL por pocillo del Conjugado diluido (preparado en un paso anterior) a todos los pocillos restantes a excepción de los pocillos Control de Lisado y ‘Blancos’.

18. Sellar las microcubetas con una Tapa para placas e incubar 30 minutos en un baño de agua a 37°C. Si se usa un incubador seco debe aumentarse en 10 minutos el tiempo de incubación.

NOTA: Durante el tiempo de incubación, realizar los dos pasos siguientes:

19. Disolver el Substrato PNPP (**PN**) añadiendo 0.5 mL de agua desionizada o destilada al vial. Volver a tapar y mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

20. Diluir el PNPP (**PN**) 1 a 100 en el Tampón de Substrato (**SB**).

Tiras:	4 - 1x8	24 - 1x8
PN	20 µL	120 µL
SB	2.0 mL	12 mL

Mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso. Se puede guardar a temperatura ambiente (22 a 25°C) no más de 45 minutos antes de ser usado.

21. PASO DE LAVADO:

- a) Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- b) Añadir 140 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- c) Aspirar o decantar.
- d) Repetir los pasos b + c para un total de 3 lavados.
- e) Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

Proceder rápidamente con los siguientes tres pasos.

22. Añadir 50 µL de la solución de PNPP diluida a todos los pocillos EXCEPTO aquellos designados como BLANCOS.

23. Dejar atemperar las microcubetas en oscuridad por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE (22 y 25°C).

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

24. Parar la reacción añadiendo 50 µL de Solución de Paro (SS) a cada pocillo en la misma secuencia que la adición del sustrato. Añadir 100 µL de Solución de Paro a los pocillos de blanco.

25. Leer la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 o 410 nm. Si no se puede leer el resultado inmediatamente, volver a poner los pocillos en oscuridad hasta un máximo de 30 minutos.

NOTA: No usar una longitud de onda de referencia cuando se proceda a la lectura de la placa en el lector de placas.

26. Restar los valores obtenidos en los pocillos BLANCOS a todos los de las muestras y controles. Muchos lectores de ELISA están programados para realizar este paso automáticamente.

27. Registrar los resultados en la Tabla de Resultados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control de calidad del MICROAMS[®] está integrado en el sistema por la inclusión de los Sueros Control Negativo y Positivo y Reactivo Control y el Reactivo Control de Lisado. Estos controles deben incluirse en cada serie para ayudar a determinar si se han producido errores técnicos o fallos del reactivo.

Criterios para un test válido:

	Control Negativo (NC)	Control Positivo (PC)
Media DO	≤ 0.300	≥ 1.000

Los pocillos con Reactivo Control de Lisado deben demostrar reacción positiva (>2x el valor obtenido en la media del control negativo). Una reacción positiva en los pocillos de Control Lisado indica que glicoproteínas HLA son capturadas en esos pocillos. Este control no identificará necesariamente un incorrecto preparado de lisado diluido, ni asegurará una apropiada reactividad serológica de la glicoproteína.

En un estudio en el que se usaron 35 muestras diferentes de lisados derivados de bazo, los resultados comunes para los pocillos correspondientes al Control Lisado Clase I tenían un rango de DO de 1.255 – 3.049 con un valor medio de DO de 2.124, mientras que para los pocillos de Control Lisado Clase II el rango de DO era de 0.766 – 2.366 siendo el valor medio de 1.808.

Lecturas de densidades ópticas de muestras de pacientes positivos obtenidas de tests en duplicado deberían caer dentro del 20 % de la media de los duplicados. Aquellas muestras cuyos resultados estén fuera de este límite deberían ser retestadas.

NOTA: Pobres duplicados pueden ser el resultado de la omisión de reactivos o muestras, de una adición errónea o mezcla de reactivos, de técnicas insuficientes de lavado, de una inapropiada temperatura durante las incubaciones, de una desalineación del lector de placas, de la exposición a luz durante la incubación final o de una contaminación cruzada. El fallo en el testaje por duplicado puede llevar a aceptar resultados erróneos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados que muestren valores de DO superiores al valor obtenido de la media de los controles negativos multiplicado por dos (2x) son considerados como resultados positivos.

LIMITACIONES

Se pueden obtener resultados erróneos debido a una contaminación bacteriana del material a testar, tiempos de incubación inadecuados, lavados o decantado de muestras celulares inadecuados, exposición de sustratos a la luz intensa, omisión de algún reactivo, exposición a temperaturas superiores o inferiores a las indicadas, lisado excesivo o incompleto u omisión de algún paso.

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

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

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

Este ensayo sólo detecta anticuerpos IgG.

Las características de funcionamiento de este producto fueron establecidas usando suero que contenía anticuerpos con reactividades conocidas contra las posiciones A, B y DR de moléculas HLA.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICO

Para asegurar la adecuada reactividad y especificidad, cada lote de MICROAMS[®] se analiza antes de comercializarlo con muestras conocidas que contienen muestras sospechosas de contener anticuerpos específicos contra HLA del donante.

Evaluación de Rendimiento

MICROAMS[®] fue testado contra el kit de GTI Antibody Monitoring System (AMS[®]) en un estudio comparativo de métodos. Un total de 100 muestras fueron evaluadas en el MICROAMS[®] y el AMS[®] para la reactividad contra HLA de Clase I. Un total de 100 muestras fueron evaluadas en el MICROAMS[®] y el AMS[®] para la reactividad contra HLA de Clase II.

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

Acuerdo: 100%

Método Comparativo: GTI Antibody Monitoring System: HLA Clase I y Clase II (AMS[®]1+2)

Clase I	Co-positividad/ Sensibilidad	Co-negatividad/ Sensibilidad
Valor	100%	100%
95% nivel de confianza (bajo)	93.1%	92.7%
95% nivel de confianza (alto)	100%	100%

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

Acuerdo: 100%

Método Comparativo: GTI Antibody Monitoring System: HLA Clase I y Clase II (AMS[®]1+2)

Clase II	Co-positividad/ Sensibilidad	Co-negatividad/ Sensibilidad
Valor	100%	100%
95% nivel de confianza (bajo)	92.7%	93.1%
95% nivel de confianza (alto)	100%	100%

Precisión

Para evaluar la precisión de MICROAMS[®], se realizaron estudios inter- e intra-ensayos. La evaluación de todos los datos fue hecha de acuerdo al NCCLS User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline EP12-A. Los datos demostraron un 100 % de concordancia intra-ensayo (n=20), un 100 % de concordancia entre ensayos (n=40) y un 100 % de concordancia inter lote (3 lotes, n=24) en los resultados obtenidos.

REFERENCIAS

1. Marsh SGE, Parham P, Barber LD, The HLA Facts Book. Academic Press 2000:84-91.
2. Rodey Glenn E. HLA Beyond Tears. De Novo, Inc. 2000; 213.
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.[®]

MICROAMS[®]

Micro-Antibody Monitoring System

- PARA USO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- ALMACENAR A 2 to 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 (S)



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

www.gtidiagnostics.com