

USO

Il QUIKSCREEN® é un (ELISA) in fase solida preparato per determinare anticorpi HLA di classe I IgG.

Per uso diagnostico in vitro.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Il sistema antigenico HLA é il maggior responsabile della sopravvivenza dell'organo nel trapianto allogenico o nella trasfusione piastrinica in pazienti sensibilizzati.¹ Gli anticorpi anti HLA possono essere acquisiti attraverso alloimmunizzazione da gravidanza, trasfusione o trapianti precedenti. In generale, l'alloimmunizzazione porta alla produzione di anticorpi anti HLA in circa il 33% degli individui esposti.²

Gli antigeni (HLA) di classe I altamente polimorfici sono ampiamente distribuiti su tutte le cellule nucleate. Le piastrine, pur non essendo nucleate, sono frammenti di megacariociti nucleati che portano gli antigeni di classe I.³

Il kit ELISA in fase solida QUIKSCREEN® fornisce glicoproteine HLA di classe I purificate per affinità da piastrine di donatori di popolazione bianca, nera ed ispanica. Le glicoproteine purificate sono immobilizzate a microstrip. Il test é disegnato per determinare anticorpi anti HLA di classe I (HLA-A-B-C).

PRINCIPIO

Il siero o plasma paziente é aggiunto a microstrip rivestite con glicoproteine HLA di classe I purificate per affinità per permettere agli anticorpi di legarsi, se presenti. Anticorpi non legati vengono lavati. Si dispensa l'antiglobulina umana coniugata con fosfatasi alcalina (Anti-IgG) ad ogni pozzetto e si incuba. Il coniugato Anti-IgG non legato viene lavato, si dispensa, infine, il substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato) dopo una incubazione di 30 minuti, si stoppa la reazione con la soluzione NaOH. La densità ottica della colorazione sviluppata è misurata fotometricamente.

REAGENTI

Numero massimo di test per kit: 44 (QS12G) o 40 (QS3G)

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

MP (QS3G)	1. Microstrip: microstrip a fondo piatto a cui sono state immobilizzate glicoproteine HLA di classe I purificate per affinità. La micropiastra o gli strip sono chiusi in busta risigillabile. Pronti all'uso.
MS (QS12G)	
TCW	2. Soluzione di Lavaggio Concentrata (10x): Tampone Tris (Idrossimetil) aminometano contenente sodio cloride e Tween 20. 1% sodio azide. Diluire con acqua deionizzata o distillata prima dell'uso. Conservare la soluzione di lavaggio a temperatura ambiente fino a 48 ore o fino a 7 giorni a 2 – 8°C.
SDQ	3. Diluente Campione: Soluzione tampone fosfato contenente albumina bovina. 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. Pronta all'uso. Usare con cautela.
AG	6. Coniugato: anti globulina umana di capra coniugata con Fosfatasi alcalina (IgG). Contiene 0.1% sodio azide. Diluire con diluente campione prima dell'uso.
PN	7. Substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato): in polvere. Sciogliere con aqua deionizzata o distillata e diluire nel tampone enzimatico prima dell'uso. Proteggere dalla luce.

- | | |
|-----------|--|
| PC | 8. Siero Controllo Positivo: siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente Campione prima dell'uso. |
| NC | 9. Siero Controllo Negativo: siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente Campione prima dell'uso. |
| PS | 10. Copripiastra. |

AVVERTENZE

- Non usare i reagenti torbidi o contaminati.
- Usare con cautela per evitare la contaminazione del Diluente campione e del Coniugato. L'eventuale contaminazione di questi reagenti con siero umano neutralizza il Coniugato e porta al fallimento del test.
- Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Strip e reagenti contenuti nel kit non devono essere usati in unione con altri kit.
- La sostituzione dei componenti del kit con altri può portare a risultati del test sbagliati.
- Gettare porzioni non utilizzate di Coniugato, di controlli diluiti, e di PNPP sciolto o diluito alla fine di ogni test.
- Per preparare le diluizioni, seguire le istruzioni del produttore per la scelta delle pipette appropriate.
- 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 nella temperatura ambientale, 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 può avere effetti sui valori di controllo, è quindi importante monitorare periodicamente il valore della temperatura ambientale.

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 dei 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 kit contengono sodio 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 finiti gettarli seguendo le regole locali.

RACCOLTA CAMPIONI

Il sangue dovrebbe essere raccolto in ACD, EDTA, eparina, citrato di sodio (plasma) o senza anticoagulante (siero) usando tecniche asettiche e dovrebbe essere testato fresco per minimizzare il rischio di possibili reazioni falsamente positive o negative causate da conservazioni improprie o contaminazione dei campioni. I campioni che non possono essere immediatamente testati 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 (2-3 anni). Comunque per evitare gli effetti del deterioramento per effetto di congelamenti e scongelamenti ripetuti, si raccomanda di aliquotare i campioni e poi congelarli.

Il siero o plasma deve essere separato dalle cellule quando conservato o trasportato.

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 o plasma umano intero. La diluizione dei campioni in diluenti diversi da quello fornito può inficiare 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. 1 Piastra 96 pozzetti (QS3G) o
12 – 1 x 8 Microstrip con supporto (QS12G)
2. 1 x 50 mL Soluzione Concentrata
3. 1 x 14 mL Diluente Campioni
4. 1 x 14 mL Tampone Substrato
5. 1 x 14 mL Soluzione Stoppante
6. 1 x 80 µL Coniugato Umano Anti-IgG
7. 1 x 50 mg Substrato PNPP (QS3G) o
6 x 50 mg Substrato PNPP (QS12G)
8. 1 x 0.3 mL Siero Controllo Positivo (QS3G)
1 x 0.45 mL Siero Controllo Positivo (QS12G)
9. 1 x 0.7 mL Siero Controllo Negativo
11. 2 Copripiastre (QS3G) o
12 Copripiastre (QS12G)

Ulteriori Materiali Richiesti:

1. Provette per campioni, controlli e diluizioni
2. Pipette
3. Micropipette graduate per dispensare 10 – 100 µL e 100 – 1.000 µL e pipette
4. Sveglia
5. Lettore per micropiastre per la lettura delle DO a 405 o 410 e 490 nm
6. Acqua deionizzata o distillata
7. Carta assorbente
8. Lavatore per micropiastre
9. Centrifuga per la separazione del siero o plasma pazienti
10. Bagno-maria o incubatore a 37°C

Metodica

1. Portare i reagenti a temperatura ambiente.
2. Preparare la soluzione di lavaggio. Diluire 1 volume di soluzione concentrata in 9 volumi di acqua deionizzata o distillata.
Miscelare bene.
3. Calcolare il numero di pazienti da testare. Usando il foglio di lavoro assegnare la posizione di ogni campione due pozzetti (in doppio).
(QS12G – Usare la parte bianca se si deve testare un solo campione.)

PREPARARE CAMPIONI E CONTROLLI

4. Diluire come segue e miscelare bene:

	Volume Diluente Campione	Volume Campione
PC	75 µL	75 µL
NC	1 campioni	75 µL
	multiplo	110 µL
	piastra	250 µL
Campione Paziente	100 µL	100 µL

5. Rimuovere gli strip piastra o supporto dalla busta. Rimuovere velocemente e risigillare nella busta gli strip inutilizzati.

NOTA: (QS12G) Con ogni kit viene fornito un solo supporto. Non gettarlo fino alla fine dell'utilizzo degli strip.

NOTA: Orientare il supporto in modo tale che il pozzetto A1 sia posizionato in alto in corrispondenza dell'angolo sinistro. Assicurarsi che tutti gli strip siano correttamente inseriti nel supporto. Etichettare o numerare ogni strip per evitare errori. Mantenere il supporto nello stesso orientamento durante l'esecuzione del test.

6. Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio ai pozzetti e lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti.

7. Aspirare o decantare e asciugare bene gli strip invertendo su carta assorbente.
8. Dispensare 50 µL dei controlli o dei campioni nei pozzetti corrispondenti sul foglio di lavoro .

NOTA: Non dispensare controllo o campioni nei pozzetti del bianco.

NOTA: (QS12G) Se si testano più campioni in una sola seduta preparare un solo set di controlli. IDENTIFICARE GLI STRIP PER EVITARE ERRORI.

9. Coprire la piastra ed incubare per 30-35 minuti a 37°C a bagno-maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.
10. Diluire il Coniugato 1 a 100 con il diluente campioni. Usare un contenitore di polipropilene.

Strips:	2 – 1 x 8	12 – 1 x 8 o Piastra
AG	10 µL	60 µL
SDQ	1.0 mL	6.0 mL

NOTA: Il coniugato é viscoso. Aspirare 2-3 volte con la pipetta prima di dispensare e sciacquare bene il puntale nel diluente. Miscelare bene.

11. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- e) Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

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

12. Dispensare 50 µL di coniugato diluito (come preparato al punto 10) in tutti i pozzetti tranne quelli destinati al BIANCO.
13. Coprire gli strip ed incubare per 30-35 minuti a 37°C in bagno maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.
14. Sciogliere il PNPP in polvere aggiungendo nel flacone 0.5 mL di acqua deionizzata o distillata. Chiudere e miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.
15. Diluire il PNPP sciolto 1 a 100 in tampone Substrato.

Strips:	2 – 1 x 8	12 – 1 x 8 o Piastra
PN	20 µL	120 µL
SB	2.0 mL	12.0 mL

Miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.

16. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- e) Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

Passare velocemente agli step successivi.

17. Dispensare 100 µL PNPP diluito a tutti i pozzetti ad eccezione dei pozzetti destinati al BIANCO.

18. 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.

19. Stappare la reazione dispensando 100 µL di soluzione stoppante ad ogni pozzetto nella stessa sequenza in cui si è aggiunto il substrato. Dispensare 200 µL di soluzione stoppante ai pozzetti del bianco.

20. Leggere le assorbanze (DO) di ogni pozzetto a 405 o 410 nm usando un filtro di riferimento a 490 nm. Se i risultati non possono essere letti immediatamente, riportare gli strip al buio per 30 minuti al massimo.

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

22. Registrare i risultati sul foglio di lavoro.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il controllo di qualità del QUIKSCREEN® è incluso in ogni kit grazie alla presenza dei sieri di controllo negativo e positivo. 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 Media	Controllo Positivo Media
Media DO	0.040 – 0.150	≥ 1.500

I valori di DO ottenuti in campioni in doppio possono variare del 20% massimo della media dei due valori. Campioni al di fuori di questi limiti dovrebbero essere ritestati.

NOTA: La non riproducibilità può essere causata da omissione dei reagenti o dei campioni, aggiunta inadeguata dei reagenti, temperatura di incubazione inadeguata, esposizione alla luce durante l'incubazione finale o cross contaminazione dei pozzetti. La non riproducibilità influenza l'accettazione dei risultati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati con valori di DO uguali o superiori a il valore ottenuto dalla media dei controlli negativi 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, 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.

Anticorpi non-HLA linfocitotossici non sono determinati da questo test.

Questo prodotto non determina anticorpi IgM, IgA, o anticorpi HLA di classe II.

Anticorpi Monospecifici verso antigeni a bassa frequenza possono non essere determinati con questo test.

Alcuni HLA non-citotossici possono essere determinati da questo test e non nel test di linfocitotossicità (LCT).

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST

Quando correttamente conservato ed usato in accordo alla procedura descritta, questo prodotto può determinare anticorpi anti-HLA di

classe I IgG.

Per garantire reattività e specificità ogni lotto di QUIKSCREEN® è testato prima della commercializzazione con campioni contenenti alloanticorpi reattivi con antigeni HLA di classe I così come campioni privi di anticorpi.

Valutazione del Test

		Metodo di Confronto		Totale
		Positivo	Negativo	
QUIKSCREEN®	Positivo	155	6	161
	Negativo	22	237	259
	Totale	177	243	420

Concordanza: 93.3%

Co-positività: 87.6% Co-negatività: 97.5%

Metodo di Confronto: Test di Linfocitotossicità (LCA)

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. Harrison J, Navarrete C., Selection of Platelet Donors and Provision of HLA Matched Platelets, in Histocompatibility Testing. Imperial College Press, 2000; 379.
4. Kao Kuo-Jang, Scornik Juan C. and, Small Scott J, et al. Enzyme-Linked Immunoassay for Anti-HLA Antibodies --An Alternative to Panel Studies by Lymphocytotoxicity. Transplantation 1993; 55:192-196.
5. Lucas DP, Paparounis ML, Meyers L, Hart JM, Zachary AA: Detection of HLA class I specific antibodies by the QuikScreen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin Lab Diagn Lab Immunol, 1997; 4:252.
6. Moore SB, Ploeger NA, DeGoey SR: HLA antibody screening: Comparison of a solid phase enzyme-linked immunoassay with antiglobulin augmented lymphocytotoxicity. Transplantation 1997; 64:1617.



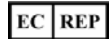
GTi DIAGNOSTICS

Good science starts with people.™

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

REF QS3G o QS12G

Rev. 2007-06-27 (I)



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

www.gtidiagnostics.com

QUIKSCREEN®

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

