

Instructions for use



Sanquin Reagents B.V.
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599
Fax: +31 20 5123570
Reagents@sanquin.nl
www.sanquin.org/reagents

MASPAT kit

REF K1360

IVD C€

053_v02 01/2017 (de)

Ausschließlich für berufliche
Zwecke

Festphasenassay zum Nachweis von Thrombozytenantikörpern

Allgemeine Informationen

Der MASPAT-Kit (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) enthält beschichtete MASPAT- **microplate** (12 Strips mit je 8 Vertiefungen), MASPAT LISS, MASPAT Anti-IgG, MASPAT positive control und MASPAT negative control. Der MASPAT-Kit erfüllt die Anforderungen der geltenden Standards und Richtlinien. Die Leistungskennzeichen sind in dem Freigabedokument aufgeführt, das auf Wunsch mit dem Produkt mitgeliefert wird. Der Test verwendet die Festphasentechnik, die auf der Reaktion zwischen Antigen und Antikörper beruht. Ein Monolayer aus Spenderthrombozyten wird auf den Innenwänden der mit thrombozytenspezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern beschichteten Mikrotiterplattenvertiefungen durch Zentrifugation immobilisiert. In entsprechenden Vertiefungen wird Patientenserum und LISS (Low Ionic Strength Solution) inkubiert, wobei Serumantikörper an den immobilisierten Thrombozytenmonolayer binden können. Nach der Inkubation werden ungebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt. Thrombozyten-gebundene Antikörper werden durch Zugabe von monoklonalem Maus-Anti-Human-IgG und gegen Human-IgG sensitivierten Erythrozyten (MASPAT Indicator Red Cells) und darauf folgende Zentrifugation der Mikrotiterplatte nachgewiesen. Im Falle einer positiven Reaktion binden das Anti-Human-IgG und die MASPAT Indicator Red Cells an die IgG-Antikörper auf dem Thrombozytenmonolayer. Positive Reaktionen sind daher gekennzeichnet durch die Anheftung von MASPAT Indicator Red Cells überall an der Wand der Vertiefungen, wohingegen negative Reaktionen scharf abgegrenzte Pellets von MASPAT Indicator Red Cells in der Mitte der Vertiefungen bilden. Das Mitführen der MASPAT positive control und MASPAT negative control bei jeder Testreihe wird ausdrücklich empfohlen. Stehen Reagenzien zur Typisierung von menschlichen Thrombozyten zur Verfügung, kann MASPAT für die Typisierung von thrombozytenspezifischen Antigenen auf Spender- und Patiententhrombozyten verwendet werden. MASPAT kann auch zum Nachweis von thrombozytenspezifischen Antikörpern eingesetzt werden, wenn typisierte Spenderthrombozyten vorhanden sind.

Bestandteile des Kits:

MASPAT microplate (REF K1366): Eine Rundboden-Mikrotiterplatte aus 12 Strips mit jeweils 8 Vertiefungen. Alle Vertiefungen sind mit thrombozytenspezifischen, monoklonalen Antikörpern beschichtet (Klon: tromb7 (6G9)).

Bei 2–8°C aufbewahren. Die MASPAT-Mikrotiterplatte befindet sich in einem zugeschweißten Plastikbeutel mit Trockenmittel. Nach dem Herausnehmen aus dem Beutel können die Vertiefungen bei Aufbewahrung bei 2–8°C bis zu 4 Wochen lang verwendet werden.

MASPAT LISS 10 ml (REF K1362): Lösung mit geringer Ionenstärke (Low Ionic Strength Solution). Aufbewahrung bei 2–8°C.

MASPAT positive control 1 ml (REF K1363): Enthält thrombozytenspezifischen Antikörpern. Aufbewahrung bei 2–8°C.

MASPAT negative control 1 ml (REF K1364): Enthält keine thrombozytenspezifischen Antikörper. Aufbewahrung bei 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 ml (REF K1361): monoklonaler Mausantikörper (Klon: MH-165) spezifisch gegen Human-IgG (IgG1, IgG2, IgG3). Aufbewahrung bei 2–8°C.

Vorsichtsmaßnahmen

Nur zum Gebrauch für die in vitro Diagnostik. Reagenzien sollten bei 2–8°C aufbewahrt werden. Undichte oder beschädigte Fläschchen dürfen nicht verwendet werden. Reagenzien (sei es ungeöffnet oder geöffnet) sollten nur bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden.

Die Reagenzien enthalten 0,1% NaN₃ (w/v) als Konservierungsmittel. Alle Blutprodukte sind auf Infektionskrankheiten getestet und für negativ befunden worden; dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass infektiöse Erreger vorhanden sind.

Bei der Verwendung und Entsorgung der Behälter und deren Inhalt sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Trübung könnte ein Zeichen für mikrobielle Kontamination sein. Um den Zustand des Reagenz zu beurteilen, wird empfohlen, das Reagenz im Rahmen der Routinemaßnahmen zur Gewährleistung der Qualität der Labortests mit geeigneten Kontrollen zu testen. Nach Abschluss des Tests sollte der Abfall entsprechend den örtlichen Regelungen entsorgt werden.

Gewinnung und Vorbereitung der Proben

Serumproben werden erhalten, indem koaguliertes Blut 10 Minuten lang bei 1500 rcf zentrifugiert wird. Werden die Proben nicht sofort getestet, sollten sie bis zur Durchführung des Tests bei <–18°C aufbewahrt werden.

Wie die Proben vorbereitet werden müssen, ist in den jeweiligen Testverfahren beschrieben.

Im Test können Thrombozytenkonzentrate (TK) oder mit Thrombozyten angereichertes Plasma (TRP) verwendet werden. Zur Herstellung von TRP wird EDTA-Vollblut bei 400 rcf 10 Minuten lang zentrifugiert. Die TRP-Fraktion kann direkt und unverdünnt verwendet werden.

Testverfahren

Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien:

- MASPAT Indicator Red Cells 0,3% (REF K1139) von sensitivierten Erythrozyten in Konservierungsmedium.
- Multikanalpipette für 50, 100 und 150 µl und Einwegspitzen.
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und Tween 20.

- Reservoirs für Multikanalpipette.
- Einwegpipetten zum Überführen aus PLASTIK.
- Mikrotiterplattenzentrifuge.
- Inkubator bei 37°C.
- Schüttler für Mikrotiterplatten.

Alle Reagenzien sollten Raumtemperatur annehmen (18–25°C).

1. Die Mikrotiterplatte mit der erforderlichen Anzahl von Vertiefungen aus dem Beutel nehmen. Die nicht benötigten Vertiefungen können in dem Plastikbeutel mit dem Trockenmittel aufbewahrt werden.
 2. 1 Tropfen (50 µl) von Spender-TRP oder -TK mit einer Transferpipette **aus Plastik** in die benötigten Vertiefungen geben (es werden Vertiefungen für die Patientenserum und für die MASPAT POSITIVE- UND MASPAT NEGATIVE CONTROL benötigt). Es empfiehlt sich, die MASPAT positive control und MASPAT negative control für den Streifen mit 8 Kavitäten durchzuführen.
 3. Die Mikrotiterplatte 5 Minuten lang bei 50 rcf zentrifugieren, um die Thrombozyten an den Wänden der Mikrotiterplattenvertiefungen zu immobilisieren (**Bremse ausschalten**).
 4. Ungebundene Thrombozyten dekantieren und entfernen, indem die Mikrotiterplatte manuell 3-mal mit 150 µl PBS/Tween 0,005% gewaschen wird. Die Waschlösung sollte tropfenweise mit einer Multikanalpipette zugegeben werden. Das PBS/Tween zwischen den Waschschritten dekantieren, indem die Platte umgedreht und ausgeschüttelt wird.
 5. 2 Tropfen (100 µl) MASPAT LISS in jede Vertiefung geben. Die Lösung ist von purpurner Farbe.
 6. Je 1 Tropfen (50 µl) der MASPAT POSITIVE- oder NEGATIVE CONTROL in die entsprechenden Vertiefungen geben. Die Positivkontrolle prüft, ob der Monolayer der Spenderthrombozyten ausreichend ist.
 7. 1 Tropfen (50 µl) Patientenserum in die übrigen Vertiefungen mit einem Monolayer von Spenderthrombozyten geben.
 8. Auf einem Schüttler für Mikrotiterplatten (Sarstedt, TPM-2) 10 Sekunden lang bei 800 rpm schütteln. Es sollte ein Farbumschlag der LISS-Lösung von purpurn nach blau stattfinden.
 9. Die Mikrotiterplatte bei 37°C 30 Minuten lang inkubieren (die Mikrotiterplatte während der Inkubation verschließen).
 10. Die Vertiefungen wie in Schritt 4 manuell 5-mal mit 150 µl PBS/Tween dekantieren und waschen.
 11. Nach dem Waschen sofort 1 Tropfen (50 µl) MASPAT Anti-IgG Reagenz in jede Vertiefung geben.
 12. Je 1 Tropfen (50 µl) der MASPAT INDICATOR RED CELLS in jede Vertiefung geben. Vorsichtig schütteln.
 13. Die Mikrotiterplatte 5 Minuten lang bei 200 rcf zentrifugieren (**Bremse ausschalten**).
 14. Die Reaktionen können nun entweder makroskopisch oder mit einem automatischen Analysegerät ausgewertet werden.
- * Werden die Waschschriffe mit einem Gerät durchgeführt, sollten die Waschschriffe nachkontrolliert werden.

Interpretation

Eine positive bzw. schwach positive Reaktion (Erythrozyten bilden eine Schicht auf dem Boden der Vertiefungen) zeigt das Vorhandensein von thrombozyten- und/oder HLA-spezifischen Antikörpern in dem Serum an.

Eine negative Reaktion (Erythrozyten bilden ein knopfartiges Pellet auf dem Boden der Vertiefungen) zeigt das Nichtvorhandensein von thrombozyten- und/oder HLA-spezifischen Antikörpern in dem Serum an.



positiv



schwach positiv



negativ

Die MASPAT negative control ist erforderlich, um an die Spenderthrombozyten gebundene Autoantikörper nachzuweisen.

Ist eine Autokontrolle des Patientenserums erforderlich, muss das Serum gegen die eigenen Thrombozyten des Patienten aus einer EDTA-Blutprobe getestet werden.

Verstärkung der Reaktivität der Thrombozyten: Die Reaktivität wird durch Einfrieren der Spenderthrombozyten (TK oder TRP) für mindestens 30 Minuten (< -18°C) bis maximal 8 Wochen verstärkt.

Die TK können mit Sequestrinpuffer verdünnt werden.

Zusammensetzung der Stammlösung des Sequestrinpuffers (10x-Konzentrat):

- 0,175 M Na₂HPO₄·2H₂O
- 0,089 M Na₂EDTA·2H₂O (Titrplex III)
- 1,54 M NaCl

Gelöst in entmineralisiertem Wasser

pH: 6,8 – 7,0

10-fach konzentrierter Sequestrinpuffer muss vor der Verwendung in entmineralisiertem Wasser 1:10 verdünnt werden.

Bei Raumtemperatur aufbewahren (18–25°C). Haltbarkeitsdauer der Stammlösung: 1 Jahr; Haltbarkeit der Arbeitslösung ist 1 Woche.

Einschränkungen

Die Waschlösung muss langsam zugegeben werden; zu heftiges Waschen könnte gebundene und ungebundene Thrombozyten entfernen. Die Oberfläche der Wände der Vertiefungen sollten opak sein, wenn die Waschschriffe richtig durchgeführt wurden. Unregelmäßige „Löcher“ in dem Thrombozytenmonolayer zeigen an, dass die Waschschriffe nicht korrekt durchgeführt wurden. Sollte dies der Fall sein, muss ein neuer Monolayer auf neuen Strips hergestellt werden (Schritte 3–5).

Falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse können die Folge einer Verunreinigung von Testmaterialien oder einer etwaigen Abweichung von der empfohlenen Technik sein. Falsch positive Ergebnisse können auftreten, wenn die Spender-/Patiententhrombozyten mit dem getesteten Serum ABO-inkompatibel sind, wenn IgG-Autoantikörper an die Spenderthrombozyten gebunden sind oder wenn die Konzentration der Thrombozyten zu gering ist

(< 0,5 × 10⁸/ml). Um zu prüfen, ob die Spenderthrombozyten Autoantikörper tragen, kann der Test mit den Spenderthrombozyten + negative control oder mit den Spenderthrombozyten + Spenderserum durchgeführt werden.

Falsch negative Ergebnisse können mit der MASPAT positive control auftreten, wenn die Antigene HPA-1a und HPA-3a auf den verwendeten Thrombozyten nicht vorhanden sind.

Bei suboptimaler Zentrifugationsgeschwindigkeit und -dauer kann es zu einer eingeschränkten Adhäsion der Thrombozyten an die Mikrotiterplatte kommen. Eine suboptimale Beschichtung der Vertiefungen führt zu einer ungenügenden Test-Performance, da sowohl die Sensitivität als auch die Stärke der Reaktionen im Endergebnis vermindert sind.

Unzureichendes Waschen vor der Zugabe von MASPAT Anti-IgG und/oder MASPAT Indicator Red Cells kann zu falsch negativen Reaktionen führen.

Zu schwaches Zentrifugieren der Mikrotiterplatte nach der Zugabe von MASPAT Indicator Red Cells kann zu falsch positiven Ergebnissen in allen Tests führen (einschließlich der Negativkontrolle). Falsch positive Reaktionen können auch die Folge einer unzureichenden Resuspension der MASPAT Indicator Red Cells sein.

Zu starkes Zentrifugieren der Mikrotiterplatte nach der Zugabe von MASPAT Indicator Red Cells kann zu falsch negativen Ergebnissen in allen Tests führen (einschließlich der Positivkontrolle).

Quellen

Lown, J.A., Ivey, J.G., Evaluation of a solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. Department of Haematology, Royal Perth Hospital, Western Australia. (Transfus. Med. 1991).

Sanquin garantiert, dass die Funktionsweise seiner Produkte der Beschreibung in der Originalgebrauchsanweisung des Herstellers entspricht. Die strikte Einhaltung der Verfahren und Testanordnungen sowie die Verwendung der empfohlenen Reagenzien und Gerätschaften ist unerlässlich. Falls der Anwender von diesen Maßgaben abweicht, lehnt Sanquin jegliche Verantwortung ab.