



MAIPA Assay 96T

IVD

REF 900006



Advanced Practical Diagnostics BV, Raadsherenstraat 3, 2300 Turnhout, Belgium

e-mail: admin@apdia.be

web site: www.apdiagroup.com



PROCEDURE MAIPA

OBJECTIF

Cette procédure est destinée à fournir des instructions techniques en vue de procéder au dépistage et à l'identification des anticorps (IgG) antiplaquettaires en utilisant la technique MAIPA (Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen assay). Ce test, décrit par Kiefel et al (Blood 70: 1722-1726, 1987) peut détecter les anticorps antiplaquettaires avec un niveau de sensibilité et de spécificité élevé, et permettre l'identification de la spécificité de l'anticorps.

DEFINITION ET PORTEE

La technique MAIPA est un test qualitatif utilisé, pour le dépistage des anticorps antiplaquettaires présents dans un sérum ou un plasma (MAIPA Indirect ou MAIPAI) et/ou pour détecter les anticorps liés aux plaquettes d'un patient (MAIPA Direct ou MAIPAD). Un résultat de test positif en MAIPA indirect nécessite une identification ultérieure de la spécificité des anticorps en utilisant la même méthode.

Le test de dépistage permet de détecter à la fois la présence d'anticorps (allo-anticorps et/ou auto-anticorps circulant) dans un sérum ou un plasma, et la présence d'anticorps liés aux plaquettes. Ce test est réalisé chez des patients présentant des maladies hématologiques, des maladies virales, ou en cas d'allo-immunisation feto-maternelle (FNAIT). Le test est également utile pour étudier les cas cliniques tels que le purpura post-transfusionnel (PTP) ou l'état réfractaire aux transfusions plaquettaires (PR). En cas de résultat positif, une identification des anticorps sera effectuée en utilisant la même technique.

Le test d'identification s'applique aux :

- échantillons de patient détectés positifs pour les anticorps antiplaquettaires.
- échantillons de femmes enceintes, quel que soit le résultat du test de dépistage des anticorps.
- échantillons de patients dont le diagnostic clinique indique une immunisation contre les plaquettes.

La technique MAIPA est également utilisée pour les réactions croisées dans les cas suivants :

- les antigènes plaquettaires du donneur et le sérum du receveur (état réfractaire aux transfusions de plaquettes).
- les antigènes plaquettaires paternels (et/ou antigènes du bébé) et le sérum de la mère (allo-immunisation néonatale-fœto-maternelle).

PRINCIPE DE LA METHODE DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION

Le principe du test repose sur la capture d'un antigène plaquettaire à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre des glycoprotéines membranaires des plaquettes humaines et l'analyse de la fixation d'anticorps humains sur cet antigène par une technique immuno-enzymatique (ELISA)

La technique est réalisée en deux étapes :

- un dépistage du complexe glycoprotéique incriminé dans l'immunisation (MAIPAI et MAIPAD)
- une identification à l'aide de plaquettes génotypées (MAIPAI seulement)

Pour le dépistage (MAIPA indirect), des plaquettes (issues d'un pool regroupant 6 à 12 donneurs de groupe érythrocytaire O sélectionnés pour leur génotype plaquettaire particulier) sont incubées avec le sérum ou le plasma à tester et un anticorps monoclonal murin spécifique d'une glycoprotéine connue. Il existe actuellement des anticorps monoclonaux murins dirigés contre les glycoprotéines suivantes : GPIIa, GPIIbIIIa, GPIbIX, GPIV, GPV, GPVI et le complexe CD109. En routine, seules les glycoprotéines GPIIa, GPIIbIIIa et GPIbIX font l'objet d'une détection.

On dispose également d'un anticorps monoclonal murin anti-β2 microglobuline (ciblant les molécules HLA de classe I) qui sera testé systématiquement, parallèlement aux réactions spécifiques, de manière à écarter cette possibilité d'immunisation. Les autres glycoprotéines peuvent être étudiées selon cette même méthode à condition de disposer des anticorps monoclonaux murins correspondants.

Après un temps d'incubation, les plaquettes sont lysées, les lysats après centrifugation sont déposés dans les puits d'une microplaque préalablement coatée avec des immunoglobulines de chèvre anti-IgG de souris.

L'anticorps monoclonal de souris couplé au complexe glycoprotéique dont il est spécifique et à l'éventuel anticorps anti-plaquettes humain est ainsi fixé au fond de la plaque. La fixation de l'anticorps anti-plaquettes humain sur ce complexe est détectée par une anti-IgG humaine de chèvre couplée à la peroxydase, elle même révélée par le TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine). Une coloration bleue apparaît témoignant de la présence d'un anticorps anti-GP (de spécificité correspondant à l'anticorps monoclonal présent pour cette réaction). Une absence de coloration révèle un résultat négatif et donc une absence d'anticorps anti-plaquettes. La réaction est arrêtée par une solution de H₂SO₄ et la couleur bleue est convertie en une quantité équivalente de couleur jaune. La lecture se fait au spectrophotomètre à 450 nm.

Pour le dépistage (MAIPA direct) des anticorps fixés sur les plaquettes provenant du prélèvement d'un patient, la première étape de la technique mettant en contact le sérum/plasma avec les plaquettes n'est pas nécessaire : la méthode est ensuite la même que celle du test indirect.

La seconde étape du test indirect consiste à identifier l'anticorps dépisté, en suivant le même protocole technique. Pour cette seconde étape, des plaquettes issues de donneurs individuels dont on connaît le génotype plaquettaire, le sérum ou le plasma et les anticorps monoclonaux murins anti-GP ayant donné un résultat positif dans la première étape seront utilisés. Cette deuxième étape n'est généralement appliquée que dans le cadre du test indirect. Si le test direct indique des anticorps liés aux plaquettes sur une ou plusieurs glycoprotéines, une exploration plus approfondie pourra être réalisée en fonction du cas clinique en présence, ceci reste exceptionnel et n'est pas effectué de manière routinière.

PROCEDURE MAIPA

1. Réactifs MAIPA Assay kit complet (REF 900006)

Pool de cellules pour le dépistage des anticorps plaquettaires

Composant	Description	Quantité, Volume	Volume nécessaire pour un test	Format
Cellules de dépistage SCREEN PLTL	Pool de plaquettes de 6 à 12 donneurs (tous de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	5 flacons, 1 ml	50 µl	Prêt à l'emploi

Panel de cellules pour l'identification des anticorps plaquettaires

Composant	Description	Quantité, Volume	Volume nécessaire pour un test	Format
Plaquette d'identification 1 IDENT PLTL 1	Plaquettes d'un donneur individuel (de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	1 flacon, 0,65 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plaquette d'identification 2 IDENT PLTL 2	Plaquettes d' un donneur individuel (de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	1 flacon, 0,65 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plaquette d'identification 3 IDENT PLTL 3	Plaquettes d' un donneur individuel (de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	1 flacon, 0,65 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plaquette d'identification 4 IDENT PLTL 4	Plaquettes d' un donneur individuel (de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	1 flacon, 0,65 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plaquette d'identification 5 IDENT PLTL 5	Plaquettes d' un donneur individuel (de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	1 flacon, 0,65 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plaquette d'identification 6 IDENT PLTL 6	Plaquettes d' un donneur individuel (de groupe érythrocytaire O), typées pour HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -15	1 flacon, 0,65 ml	50 µl	Prêt à l'emploi

Plasmas/sérums de contrôle

Composant	Description	Quantité, Volume	Volume nécessaire pour un test	Format
Plasma/sérum de contrôle CONTR 1a	Anti-HPA-1a positif	1 flacon, 0,4 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plasma/sérum de contrôle CONTR 5b	Anti-HPA-5b positif	1 flacon, 0,4 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plasma/sérum de contrôle CONTR HLA	Anti-HLA positif	1 flacon, 0,4 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Plasma/sérum de contrôle CONTR NEG	Négatif	3 flacons, 3 x 0,4 ml	50 µl	Prêt à l'emploi

Réactifs pour le MAIPA

Composant	Description	Quantité, Volume	Volume nécessaire pour un test	Format
Microplaque MTP	12 barrettes individuelles	1 plaque, 96 puits	N/A	Prêt à l'emploi
Anticorps MAB Ib111a	Anti-GPIIb/IIIa, 10 µg/ml	2 flacons, 2 x 1,2 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Anticorps MAB I1a1a	Anti-GPIIa, 10 µg/ml	1 flacon, 1,8 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Anticorps MAB IbIX	Anti-GPIbIX, 10 µg/ml	1 flacon, 1,5 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Anticorps MAB HLA	Anti-HLA (B2M), 10 µg/ml	1 flacon, 1,5 ml	50 µl	Prêt à l'emploi
Tampon de lavage de cellule CELLWASHBUF 10x	Tampon de lavage plaquettaire MAIPA	1 flacon, 20 ml	(2+2+4) x 200 µl	10x
Tampon de lyse plaquettaire LYSBUF	Tampon de lyse plaquettaire MAIPA	1 flacon, 15 ml	130 µl	Prêt à l'emploi

Réactifs de détection ELISA

Composant	Description	Quantité, Volume	Volume nécessaire pour un test	Format
Plaque de microtitration coâtée COATMTP	Plaque de microtitration coâtée d'IgG de chèvre anti-souris	1 plaque, 96 puits	N/A	Prêt à l'emploi
Conjugué CONJ	IgG-HRP de chèvre anti-humain	1 flacon, 12 ml	100 µl	Prêt à l'emploi
Tampon de lavage ELISA ELISAWASHBUF 20x	Tamponné de TRIS Triton X-100 / Tween 20	1 flacon, 50 ml	12 x 200 µl	20x
Chromogène TMB CHROM	TMB	1 flacon, 12 ml	100 µl	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt STOPSOOL	0,5 M H ₂ SO ₄	1 flacon, 12 ml	100 µl	Prêt à l'emploi

2. Réactifs supplémentaires requis

Eau distillée (pour la dilution des tampons concentrés).

PBS 1x w/1 % BSA, w/0,33 % EDTA (pour la préparation des plaquettes du patient, destinées à l'usage dans un MAIPA direct).

3. Matériel requis

Micropipettes de 10-100 µl et embouts

Pipette multi-canaux de 100-250 µl et embouts

Tubes et flacons pour dilution des réactifs

Réservoirs pour réactifs

Mélangeur Vortex

Agitateur de microplaques

Lecteur de microplaques pour mesurer les densités optiques à 450 nm et filtre de référence à 600-650 nm

Centrifugeuse de microplaques, validé pour MAIPA (voir section 8)

Incubateur à 36 ± 1 °C

Enceinte réfrigérée à 2 – 8 °C

Papier absorbant

4. Avertissements et Précautions

4.1. Uniquement pour l'utilisation diagnostique *in vitro*.

4.2. Pour l'utilisation en laboratoire professionnel.

4.3. Ne mélanger pas des réactifs ou plaques coatées qui appartiennent aux kits avec un numéro de lot différent.

4.4. Traiter les témoins et les échantillons comme s'ils contenaient des agents infectieux.

4.5. Éliminer les échantillons des patients et tous les matériaux utilisés pour effectuer l'essai comme s'ils étaient contaminés par des substances potentiellement infectieuses.

4.6. Stop Solution est une solution H₂SO₄ de 0,5 M qui est gênante. En cas de contact avec les yeux ou la peau, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.

4.7. Le tampon de lyse plaquettaire et le tampon de lavage ELISA contiennent la substance Triton X-100. Il s'agit d'un tensioactif appartenant au groupe des éthoxylates d'octylphénol qui a été inscrit à l'annexe XIV (Liste d'autorisation) du règlement REACH n° 1907/2006.

Ces substances ont, par leur dégradation, des propriétés perturbant le système endocrinien pour lesquelles il est scientifiquement prouvé qu'elles peuvent avoir des effets graves sur l'environnement.

Classification pour le tampon de lyse plaquettaire :

Mention d'avertissement : Attention

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence applicables :

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.

P391 : Recueillir le produit répandu.

Classification pour le tampon de lavage ELISA :

Mention d'avertissement : Danger

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

H318 : Provoque de graves lésions des yeux.

H315 : Provoque une irritation cutanée.

H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence applicables :

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.

P310 : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

P391 : Recueillir le produit répandu.

- 4.8.** Chromogène TMB contient la substance dangereuse N-Méthyl-2-pyrrolidone à une concentration de > 0,3 %. N-Méthyl-2-pyrrolidone est classée comme Substance Toxique pour la Reproduction Catégorie 1B.

Mention d'avertissement : Danger

H360D : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.

Conseils de prudence applicables:

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P308+P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.

- 4.9.** Quelques réactifs du kit MAIPA contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'Azoture de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb ou cuivre pour former des azides métalliques potentiellement explosifs. Faire couler de grandes quantités d'eau dans la tuyauterie après avoir jeté ces réactifs.

- 4.10.** Après avoir obtenu les résultats, aucune décision ne doit être prise sans d'abord consulter la pertinence médicale de ces résultats.

- 4.11.** Les incidents graves liés au test MAIPA doivent être signalés au fabricant.

5. Echantillon

Le sérum ou le plasma peuvent être utilisés pour un MAIPA indirect.

Les spécimens peuvent être conservés à 2 – 8 °C pendant 3 à 4 jours ou ils peuvent être conservés congelés à -20 °C pendant au moins un an.

Des plaquettes isolées à partir de sang total prélevé sur EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) peuvent être utilisées pour un MAIPA direct. Le sang est centrifugé à 200 g pendant 10 minutes pour constituer un plasma riche en plaquettes (PRP). Le PRP est ensuite centrifugé à 2050 g pendant 10 minutes pour culotter les plaquettes. Après élimination du plasma, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS/ EDTA 0.33% et ajustées à $500 \cdot 10^6$ /ml dans le même tampon additionné de 1% de BSA (la quantité minimale recommandée de plaquettes pour un test autologue est de $5 \cdot 10^6$ /puits).

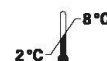
La suspension plaquettaire du patient peut être conservée à 2 – 8 °C pendant 5 jours.

6. Contrôles

Des échantillons de contrôle interne, positifs et négatif, doivent être inclus dans chaque détermination pour valider les résultats. Deux puits destinés au contrôle de réactifs (vides) doivent être inclus dans toutes les procédures de test.

Un ensemble de 4 contrôles plasmas/sérums (CONTR 1a, CONTR 5b, CONTR HLA, CONTR NEG) est inclus dans chaque MAIPA kit complet.

7. Préparation et stockage des réactifs



Tous les réactifs doivent être conservés à une température située entre 2 et 8 °C.

Tous les réactifs peuvent être conservés à une température située entre 2 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

La totalité de la procédure MAIPA dure environ 6 heures: la quantité de tous les réactifs nécessaire sera sortie du réfrigérateur immédiatement avant l'utilisation. La température du laboratoire dans lequel est utilisé le kit doit se situer entre 19 et 25°C.

Les réactifs restants, non utilisés, doivent être replacés à une température située entre 2 et 8 °C dès que possible. Les réactifs doivent être utilisés dans un délai de deux mois après la première ouverture.

Les deux tampons de lavage concentrés 10x et 20x peuvent être dilués et conservés à température ambiante pendant la durée du test. Conserver les tampons non utilisés à une température située entre 2 et 8 °C après le test.

Le tampon de lavage de cellules, concentré 10x peut contenir des cristaux de phosphate après une conservation à 4 °C. Ces cristaux disparaîtront à température ambiante. Attendre que tous les cristaux aient disparu avant de commencer la dilution du tampon de lavage de cellule.

8. Procédure de test : information générale

MÉTHODE EN MICROPLAQUE pour incubation de plaquettes et lavages !

Les échantillons peuvent être testés en simple ou en duplicate, il est cependant conseillé de réaliser l'examen en duplicate.

Les étapes de lavages peuvent être réalisées à l'aide d'un laveur automatique, il faudra valider cette manière de faire.

Les étapes de centrifugation sont réalisées à température du laboratoire soit 19- 25°C.
Il est important de valider la convivialité de votre centrifugeuse au regard de la procédure MAIPA.

Une centrifugeuse équipée d'un rotor libre avec 4 nacelles et microplaques positionnées face-à-face selon leur largeur est préférée.

Exemple : centrifugeuse Eppendorf 5810 avec rotor A-4-81 ou rotor A-4-62.

Nous ne recommandons pas une centrifugeuse équipée d'un rotor libre avec 2 nacelles et microplaques positionnées face-à-face selon leur longueur.

Exemple : centrifugeuse Eppendorf 5430 avec rotor A-2-MTP.

A part l'utilisation de cellules de dépistage ou de cellules d'identification, la procédure MAIPA est identique que ce soit pour un test de dépistage ou un test d'identification d'anticorps anti-plaquettes. Ainsi il est possible de combiner le dépistage et l'identification en même temps et sur une même microplaque.

La procédure complète est décrite ci-dessous. Les légères différences entre le dépistage et l'identification sont décrites en détail à chaque étape respective de la procédure (étapes 9.2., 9.3. et 9.5.). Toutes les autres étapes sont identiques pour le dépistage et l'identification.

9. Procédure de test MAIPA Indirect (MAIPAI): description détaillée

9.1. Préparation des réactifs

9.1.1. Diluer (1/10) le TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE (CELLWASHBUF 10x) avec de l'eau distillée et le conserver à température ambiante (19 à 25 °C).

9.1.2. Diluer (1/20) le TAMPON DE LAVAGE ELISA (ELISAWASHBUF 20x) avec de l'eau distillée et le conserver à température ambiante (19 à 25 °C).

9.2. Préparation des plaquettes

POUR LE DEPISTAGE D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

9.2.1. d Retirer la MICROPLAQUE non coatée (MTP) de l'emballage. Prendre le nombre nécessaire de barrettes de 8 puits et les placer dans un support vide (ne pas oublier les contrôles). Si la plaque n'est pas utilisée entièrement, replacer les puits restants/la plaque restante dans l'emballage. Prévoir autant de puits que de patients et de glycoprotéines ciblées à tester. Généralement, 8 puits par patient sont nécessaires pour un test de dépistage d'anticorps anti-plaquettes, soit 4 puits pour un MAIPA direct et 4 puits pour un MAIPA indirect. Pour ces deux tests, les 4 glycoprotéines (GP) sont testées séparément dans 4 puits différents.

Pour chaque test de dépistage, prévoir 6 puits supplémentaires pour les contrôles: 2 puits (blancs) pour les contrôles « réactif » vides en positions A1 et B1; 3 plasmas/sérums de contrôle positifs dans les puits C1 (anti-HPA-1a), D1 (anti-HPA-5b) et E1 (anti-HLA) et 1 plasma/sérum de contrôle négatif dans le puits F1.

- 9.2.2. d Pour un MAIPA indirect, ajouter 50 µl de CELLULES DE DEPISTAGE (SCREEN PLTL) dans les puits « échantillon » et les puits « contrôle ». **Les tubes « cellules de dépistage » sont prêts à l'emploi.**
- 9.2.3. d Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque **et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits**. Agiter doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute ; d'abord 10 secondes dans une direction, puis 10 secondes dans la direction opposée).
- 9.2.4. d Laver les plaquettes comme suit: ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué, dans chaque puits et centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque **et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits**. Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.2.5. d Répéter l'étape 9.2.4. d une fois (ce qui donne un total de 2 lavages).

POUR L'IDENTIFICATION D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

- 9.2.1. i Retirer la MICROPLAQUE non coatée (MTP) de l'emballage et procéder comme décrit dans l'étape 9.2.1. d.

Pour un test d'identification d'anticorps anti-plaquettes (MAIPA indirect) 6 puits sont nécessaires par échantillon déterminé positif au cours du test de dépistage. Un échantillon peut réagir avec plusieurs anticorps monoclonaux. Généralement, l'identification est effectuée avec l'anti-GPIIb/IIIa et/ou GPIIb/IIIa. L'identification n'est pas effectuée pour les échantillons qui ont réagi positivement aux anticorps anti-HLA lors du dépistage.

Dans le cas où le test d'identification serait effectué séparément, prévoir 6 puits supplémentaires pour les contrôles: 2 puits (blancs) pour les contrôles « réactif » vides en positions A1 et B1; 3 plasmas/sérums de contrôle positifs dans les puits C1 (anti-HPA-1a), D1 (anti-HPA-5b) and E1 (anti-HLA) et 1 plasma/sérum de contrôle négatif dans le puits F1.

Les laboratoires traitant peu d'échantillons pourraient préférer limiter le nombre de contrôles utilisés. Dans ce cas, nous recommandons de n'utiliser que 3 puits de contrôle: 1 puits blanc en position A1; 1 plasma/sérum de contrôle positif dans le puits B1 et 1 plasma/sérum de contrôle négatif dans le puits C1. Il est recommandé d'utiliser le contrôle positif qui réagit avec l'anticorps monoclonal ayant donné une réaction positive dans l'étape de dépistage.

- 9.2.2. i Pour un MAIPA d'identification d'anticorps antiplaquettaires (indirect), ajouter 50 µl de chaque PLAQUETTE D'IDENTIFICATION (IDENT PLTL) dans les puits d'échantillons respectifs. Ajouter 50 µl de CELLULES DE DEPISTAGE (SCREEN PLTL) dans les puits de contrôle. **Les tubes « cellules de dépistage » et les tubes « cellules d'identification » sont prêts à l'emploi.**
- 9.2.3. i Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque **et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits**. Agiter doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute ; d'abord 10 secondes dans une direction, puis 10 secondes dans la direction opposée).
- 9.2.4. i Laver les plaquettes comme suit : ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué, dans chaque puits et centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque **et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits**. Mélanger doucement comme décrit précédemment).
- 9.2.5. i Répéter l'étape 9.2.4. i une fois (ce qui donne un total de 2 lavages).

9.3. Incubation des plaquettes avec le sérum

POUR LE DEPISTAGE D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

- 9.3.1. d Pour le test de dépistage des anticorps antiplaquettaires (MAIPA indirect), ajouter 50 µl de sérum/plasma provenant du patient dans 4 puits contenant CELLULES DE DEPISTAGE (SCREEN PLTL). Ajouter 50 µl de PLASMA/SERUM DES CONTROLES (CONTR) dans les puits respectifs.
- 9.3.2. d Mélanger doucement manuellement ou en utilisant un agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700-1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.3.3. d Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.

- 9.3.4. d Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).

POUR L'IDENTIFICATION D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

- 9.3.1. i Pour un test d'identification d'anticorps antiplaquettaires (MAIPA indirect), ajouter 50 µl de plasma/sérum provenant du patient dans 6 puits contenant les différentes PLAQUETTES D'IDENTIFICATION (IDENT PLTL).
Ajouter 50 µl de PLASMA/SERUM DES CONTROLES (CONTR) dans les puits respectifs.
- 9.3.2. i Mélanger doucement manuellement ou en utilisant un agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700-1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.3.3. i Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.
- 9.3.4. i Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).

9.4. Retrait des immunoglobulines non liées

- 9.4.1. Laver la MICROPLAQUE (MTP) comme suit : ajouter 200 µl de tampon de lavage de cellule dilué, dans chaque puits et centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.4.2. Répéter l'étape 9.4.1 une fois (ce qui donne un total de 2 lavages).

9.5. Incubation des plaquettes avec l'anticorps monoclonal

POUR LE DEPISTAGE D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

- 9.5.1. d Pour le test de dépistage des anticorps antiplaquettaires, ajouter 50 µl de chaque ANTICORPS MONOCLONAL (MAB) dans les 4 puits respectifs contenant les CELLULES DE DEPISTAGE (SCREEN PLTL) (MAIPA indirect).
Pour les contrôles, ajouter 50 µl d'anti-GPIIbIIIa (MAB IIbIIIa) dans le puits C1 (anti-HPA-1a), 50 µl d'anti-GPIIa (MAB IaIIa) dans le puits D1 (anti-HPA-5b) et 50 µl d'anti-béta2 microglobuline (MAB HLA) dans le puits E1 (anti-HLA). Enfin, ajouter 50 µl d'anti-GPIbIX (MAB IbIX) ou 50 µl d'anti-GPIIbIIIa (MAB IIbIIIa) ou 50 µL d'anti-GPIIa (MAB IaIIa) dans le puits F1 (contrôle négatif).
- 9.5.2. d Mélanger doucement manuellement ou en utilisant un agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700-1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.5.3. d Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.
- 9.5.4. d Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).

POUR L'IDENTIFICATION D'ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

- 9.5.1. i Pour un test d'identification d'anticorps antiplaquettaires, ajouter 50 µl D'ANTICORPS MONOCLONAL (MAB) (celui ou ceux qui ont généré(s) un résultat positif dans un test de dépistage) dans chacun des 6 puits contenant les PLAQUETTES D'IDENTIFICATION (IDENT PLTL). Pour les contrôles, ajouter 50 µl d'anti-GPIIbIIIa (MAB IIbIIIa) dans le puits C1 (anti-HPA-1a), 50 µl d'anti-GPIIa (MAB IaIIa) dans le puits D1 (anti-HPA-5b) et 50 µl d'anti-béta2 microglobuline (MAB HLA) dans le puits E1 (anti-HLA). Enfin, ajouter 50 µl d'anti-GPIbIX (MAB IbIX) ou 50 µl d'anti-GPIIbIIIa (MAB IIbIIIa) ou 50 µL d'anti-GPIIa (MAB IaIIa) dans le puits F1 (contrôle négatif).
[Pour les laboratoires traitant peu d'échantillons et utilisant un nombre de contrôles limité \(voir 9.2.1. i\):](#) ajouter 50 µl de l' ANTICORPS MONOCLONAL (MAB) correspondant au contrôle positif choisi dans le puits B1 (e.g. anti-GPIIbIIIa dans le puits contenant le contrôle anti-HPA-1a ou anti-GPIIa dans le puits contenant le contrôle anti-HPA-5b). Ajouter 50 µl du même anticorps monoclonal dans le puits C1 pour le contrôle négatif.

- 9.5.2. i Mélanger doucement manuellement ou en utilisant un agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700-1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.5.3. i Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.
- 9.5.4. i Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à $1050 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$ pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque **et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits**. Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).

9.6. Retrait des anticorps monoclonaux non liés

- 9.6.1. Laver la MICROPLAQUE (MTP) comme suit: ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué dans chaque puits et centrifuger à $1050 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$ pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque **et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits**. Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 9.6.2. Répéter l'étape 9.6.1 trois fois (ce qui donne un total de 4 lavages).

9.7. Solubilisation des membranes plaquettaires

- 9.7.1. Ajouter 130 µl de TAMPON DE LYSE DE PLAQUETTES (LYSBUF) dans tous les puits et mélanger énergiquement les culots plaquettaires en agitant par pipetages et refoulements. **Cette manipulation génère de la mousse qui est nécessaire pour une lyse efficace des plaquettes. Prendre soin de ne pas générer de contamination croisée entre les puits.**
- 9.7.2. Incuber pendant au minimum 15 minutes à 2 - 8 °C.
- 9.7.3. Centrifuger à $1050 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$ pendant 15 minutes.
Les complexes immuns (MAB, GP et anticorps humains) restent dans le liquide surnageant, alors que les débris de cellules restent au fond du puits.
Remarque : après ou avant la centrifugation, les lysats peuvent être conservés à 2 - 8 °C pendant une nuit, si nécessaire.

9.8. Transfert des lysats plaquettaires vers une microplaque coatée avec des IgG de chèvre anti-souris

- 9.8.1. Retirer la MICROPLAQUE RECOUVERTE D'IgG de chèvre anti-souris (COATMTP) de son emballage en aluminium. Prendre le nombre nécessaire de barrettes de 8 micro-puits et les placer dans un support vide (si la plaque n'est pas utilisée entièrement). Replacer les micro-puits/la plaque restants/restante dans l'emballage. Prévoir autant de puits que de patients et de glycoprotéines ciblées à tester.
- 9.8.2. Transférer 100 µl de lysat cellulaire surnageant dans les puits coatés d'IgG de chèvre anti-souris **sans toucher ni aspirer les débris au fond des puits de la première plaque.**
- 9.8.3. Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.

9.9. Retrait des protéines de lysat non liées

- 9.9.1. Vider les puits en retournant la MICROPLAQUE (COATMTP) et en tapotant vigoureusement la plaque sur du papier absorbant.
- 9.9.2. Laver la microplaque comme suit: ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE ELISA dilué, dans chaque puits, vider les puits en retournant la microplaque et tapoter vigoureusement la plaque sur du papier absorbant.
Remarque : Il est recommandé d'utiliser la technique du pipetage inverse pour les étapes de lavage, de façon à éviter les bulles dans la solution de lavage (risque de contamination croisée).
- 9.9.3. Répéter l'étape 9.9.2 cinq fois (ce qui donne un total de 6 lavages).
- 9.9.4. S'assurer que les puits sont secs après l'étape finale de lavage.

9.10. Ajout d'anti-IgG-humaines de chèvre conjuguées à la peroxydase

- 9.10.1. Ajouter 100 µl d'anti-IgG humaines de chèvre HRP CONJUGUEES (CONJ) dans chaque puits.
- 9.10.2. Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.

9.11. Retrait d'anti-IgG -humaines de chèvre conjuguées à la peroxydase non liées

- 9.11.1. Vider les puits en retournant la MICROPLAQUE (COATMTP) et en tapotant vigoureusement la plaque sur du papier absorbant.

- 9.11.2. Laver la MICROPLAQUE (COATMTP) comme suit: ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE ELISA dilué, dans chaque puits, vider les puits en retournant la microplaque et tapoter vigoureusement la plaque sur du papier absorbant.
[Remarque](#) : Il est recommandé d'utiliser la technique du pipetage inverse pour les étapes de lavage, de façon à éviter les bulles dans la solution de lavage (risque de contamination croisée).
- 9.11.3. Répéter l'étape 9.11.2 cinq fois (ce qui donne un total de 6 lavages).
- 9.11.4. S'assurer que les puits sont secs après l'étape finale du lavage.

9.12. Ajout de substrat TMB

- 9.12.1. Ajouter 100 µl de SOLUTION DE TMB (CHROM) dans chaque puits.
[Remarque](#) : Veiller à protéger intégralement la solution de TMB de toute source de lumière.
- 9.12.2. Incuber pendant 15 minutes à 36 ± 1 °C dans l'obscurité.

9.13. Ajout d'acide pour stopper le développement de la coloration

- 9.13.1. Ajouter 100 µl de SOLUTION D'ARRET (STOPSOL) (H₂SO₄) dans chaque puits.

9.14. Lecture de la microplaque

- 9.14.1. Mesurer la densité optique à 450 nm et filtre de référence à 600-650 nm dans un lecteur de microplaque et enregistrer les résultats.

10. Procédure de test MAIPA Direct (MAIPAD)

La procédure d'essai pour un MAIPA direct est généralement la même que la procédure pour un MAIPA indirect telle que décrite dans section 9.

Dans la première partie du MAIPA, une suspension préparée des plaquettes du patient est utilisée à la place des plaquettes de dépistage du kit.

Les anticorps détectés lors de la MAIPA directe sont des auto-anticorps dirigés contre les glycoprotéines (GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa ou GPIIb/IX) sur les plaquettes du patient, ciblant des épitopes qui ont une présence commune sur les différentes glycoprotéines plaquettaires et pas dirigés contre un antigène plaquettaire HPA spécifique. Par conséquent, aucune identification supplémentaire avec les cellules du panel d'identification du kit MAIPA n'est déployée.

10.1. Préparation des plaquettes

- 10.1.1. Retirer la MICROPLAQUE non coatée (MTP) de l'emballage. Prendre le nombre nécessaire de barrettes de 8 puits et les placer dans un support vide (ne pas oublier les contrôles). Si la plaque n'est pas utilisée entièrement, replacer les puits restants/la plaque restante dans l'emballage. Prévoir autant de puits que de patients et de glycoprotéines ciblées à tester.
Généralement, 8 puits par patient sont nécessaires pour un test de dépistage d'anticorps anti-plaquettaires, soit 4 puits pour un MAIPA direct et 4 puits pour un MAIPA indirect. Pour ces deux tests, les 4 glycoprotéines (GP) sont testées séparément dans 4 puits différents.
Pour chaque test de dépistage, prévoir 6 puits supplémentaires pour les contrôles: 2 puits (blancs) pour les contrôles « réactif » vides en positions A1 et B1; 3 plasmas/sérums de contrôle positifs dans les puits C1 (anti-HPA-1a), D1 (anti-HPA-5b) et E1 (anti-HLA) et 1 plasma/sérum de contrôle négatif dans le puits F1.
- 10.1.2. Ajouter 50 µl de CELLULES DE DEPISTAGE (SCREEN PLTL) dans les puits pour les contrôles.
[Les tubes « cellules de dépistage » sont prêts à l'emploi.](#)
Pour un MAIPA direct, ajouter 50 µl de plaquettes provenant du patient (suspension préparée comme décrit dans section 5) dans les puits prévus. [Normalement la quantité nécessaire de plaquettes à ajouter est \$25 \times 10^6\$. Néanmoins \$5 \times 10^6\$ cellules peuvent être suffisantes pour des échantillons provenant de patients thrombopéniques.](#)
Les plaquettes pour le test direct peuvent être préférablement ajoutées à l'étape suivante (ajout du sérum ou plasma), les plaquettes provenant d'un prélèvement de patient étant déjà lavées.
- 10.1.3. Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à $1050 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$ pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits.](#)

Agiter doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute ; d'abord 10 secondes dans une direction, puis 10 secondes dans la direction opposée).

- 10.1.4. Laver les plaquettes comme suit: ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué, dans chaque puits et centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes.
Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 10.1.5. Répéter l'étape 10.1.4. une fois (ce qui donne un total de 2 lavages).

10.2. Incubation des plaquettes avec le sérum

- 10.2.1. Pour un MAIPA direct, il n'est pas nécessaire d'ajouter du plasma/sérum : les anticorps sont déjà liés sur les plaquettes du patient.
Ajouter pourtant 50 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué aux puits assignés aux échantillons afin d'éviter le dessèchement des plaquettes du patient. [Ou les plaquettes du patient peuvent être ajoutées à cette étape si cela n'avait pas déjà été fait à l'étape 10.1.2.](#)
Ajouter 50 µl de PLASMA/SERUM DES CONTROLES (CONTR) dans les puits respectifs.
- 10.2.2. Mélanger doucement manuellement ou en utilisant un agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700-1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 10.2.3. Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.
- 10.2.4. Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).

10.3. Retrait des immunoglobulines non liées

- 10.3.1. Laver la MICROPLAQUE (MTP) comme suit : ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué, dans chaque puits et centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#).
Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 10.3.2. Répéter l'étape 10.3.1 une fois (ce qui donne un total de 2 lavages).

10.4. Incubation des plaquettes avec l'anticorps monoclonal

- 10.4.1. Ajouter 50 µl de chaque ANTICORPS MONOCLONAL (MAB) dans les 4 puits respectifs contenant les plaquettes du patient (MAIPA direct).
Pour les contrôles, ajouter 50 µl d'anti-GPIIbIIIa (MAB IIbIIIa) dans le puits C1 (anti-HPA-1a), 50 µl d'anti-GPIIa (MAB IaIIa) dans le puits D1 (anti-HPA-5b) et 50 µl d'anti-béta2 microglobuline (MAB HLA) dans le puits E1 (anti-HLA). Enfin, ajouter 50 µl d'anti-GPIbIX (MAB IbIX) ou 50 µl d'anti-GPIIbIIIa (MAB IIbIIIa) ou 50 µL d'anti-GPIIa (MAB IaIIa) dans le puits F1 (contrôle négatif).
- 10.4.2. Mélanger doucement manuellement ou en utilisant un agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700-1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 10.4.3. Incuber pendant 30 ± 5 minutes à 36 ± 1 °C.
- 10.4.4. Centrifuger la MICROPLAQUE (MTP) à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).

10.5. Retrait des anticorps monoclonaux non liés

- 10.5.1. Laver la MICROPLAQUE (MTP) comme suit: ajouter 200 µl de TAMPON DE LAVAGE DE CELLULE dilué dans chaque puits et centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 3 minutes. Vider les puits en retournant la microplaque [et en prenant soin de garder les cellules au fond des puits](#). Mélanger doucement les plaquettes en utilisant l'agitateur de microplaques (2 x 10 secondes à 700 à 1000 trs/minute comme décrit précédemment).
- 10.5.2. Répéter l'étape 10.5.1. trois fois (ce qui donne un total de 4 lavages).

10.6. Solubilisation des membranes plaquettaires

- 10.6.1. Ajouter 130 µl de TAMPON DE LYSE DE PLAQUETTES (LYSBUF) dans tous les puits et mélanger énergiquement les culots plaquettaires en agitant par pipetages et refoulements. Cette manipulation génère de la mousse qui est nécessaire pour une lyse efficace des plaquettes. Prendre soin de ne pas générer de contamination croisée entre les puits.
- 10.6.2. Incuber pendant au minimum 15 minutes à 2 - 8 °C.
- 10.6.3. Centrifuger à 1050 g ± 50 g pendant 15 minutes.
Les complexes immuns (MAB, GP et anticorps humains) restent dans le liquide surnageant, alors que les débris de cellules restent au fond du puits.
Remarque : après ou avant la centrifugation, les lysats peuvent être conservés à 2 - 8 °C pendant une nuit, si nécessaire.

10.7. Partie ELISA de la procédure MAIPA

Continuer avec la partie ELISA de la procédure MAIPA comme décrit dans les étapes 9.8 à 9.14.

11. Version courte de la procédure MAIPA

Une résumé concise de la procédure MAIPA complète est ajouté en annexe à ce mode d'emploi.

INTERPRETATION ET VALIDATION DES RESULTATS DE TEST

La validation du test dépend des valeurs de DO des échantillons de contrôle. En général, on peut dire que (après soustraction de la valeur du blanc):

- La valeur de DO pour le contrôle négatif doit être inférieure à 0,100
- La valeur de DO pour les contrôles positifs doit être supérieure à 0,500

De notre côté, l'interprétation des tests est relativement simple, avec une valeur-seuil de DO = 0,200 (après soustraction de la valeur du blanc):

- Les valeurs de DO supérieures à 0,200 sont considérées comme positives
- Les valeurs de DO inférieures à 0,200 sont considérées comme négatives

Il est cependant fortement conseillé à chaque laboratoire de déterminer sa propre valeur-seuil en utilisant un panel d'échantillons négatifs, ainsi que les critères d'acceptation relatifs à la DO pour les contrôles négatifs et positifs. Lorsque des contrôles internes sont utilisés, chaque laboratoire doit définir les valeurs de DO seuil et de positivité correspondantes pour la validation du test.

1. Pour le test de dépistage d'anticorps anti-plaquettes, les examens sont réalisés en utilisant un pool de cellules et 4 anticorps monoclonaux différents. Si ces réactions donnent des résultats négatifs, aucune mesure supplémentaire n'est requise. Si l'une ou plusieurs des réactions donnent un résultat positif, un test d'identification d'anticorps anti-plaquettes est réalisé en utilisant le (les) anticorps monoclonal(aux) qui a/ont engendré(s) un test de dépistage positif.
2. Pour un test d'identification d'anticorps anti-plaquettes, on utilise au moins 4 cellules (de génotype connu) du panel d'identification et le (les) anticorps monoclonal (aux) qui a/ont engendré(s) un test de dépistage positif.

PARAMETRES DE PERFORMANCE

Une étude de validation dans un laboratoire d'immunologie plaquettaire de référence français a montré les performances suivantes:

1. **Sensibilité** : 29 échantillons positifs, contenant un anticorps anti-plaquette spécifique (de taux +/- important) ont été analysés en triplicate dans la technique MAIPA utilisant le kit de la société Advanced Practical Diagnostics. Dans cette étude, 2/(29*3) tests ont été trouvés négatifs pour deux échantillons avec un faible taux d'anticorps, soit une sensibilité de **97.8%**.
2. **Spécificité** : Dans la même étude, 326 échantillons négatifs ont été analysés en utilisant les mêmes réactifs. 325 échantillons ont été identifiés négatifs, montrant une spécificité de **99.7%**.

LIMITES

La méthode MAIPA est considérée comme la méthode de référence pour la détection et l'identification des anticorps antiplaquettaires.

Des faux-positifs et des faux-négatifs peuvent apparaître en cas de contamination bactérienne ou autre.

En cas de résultat faux ou incohérent, nous recommandons de faire analyser l'échantillon par un autre laboratoire spécialisé en diagnostics plaquettaires ou dans un laboratoire de référence en termes d'analyses plaquettaires.

La sensibilité et la spécificité de la MAIPA sont élevées mais n'atteignent pas les 100%. En outre, pour obtenir des résultats de test fiables, il est nécessaire de respecter scrupuleusement le protocole donné. Le test est conçu pour détecter les anticorps antiplaquettaires de type IgG uniquement.

Le risque de « faux positifs » dû à une contamination croisée (puits à puits) reste possible lors des différentes étapes de la technique. Ceci est inhérent à la manipulation des microplaques. Toutes les précautions et recommandations décrites dans cette procédure doivent être respectées de manière à minimiser ce risque.

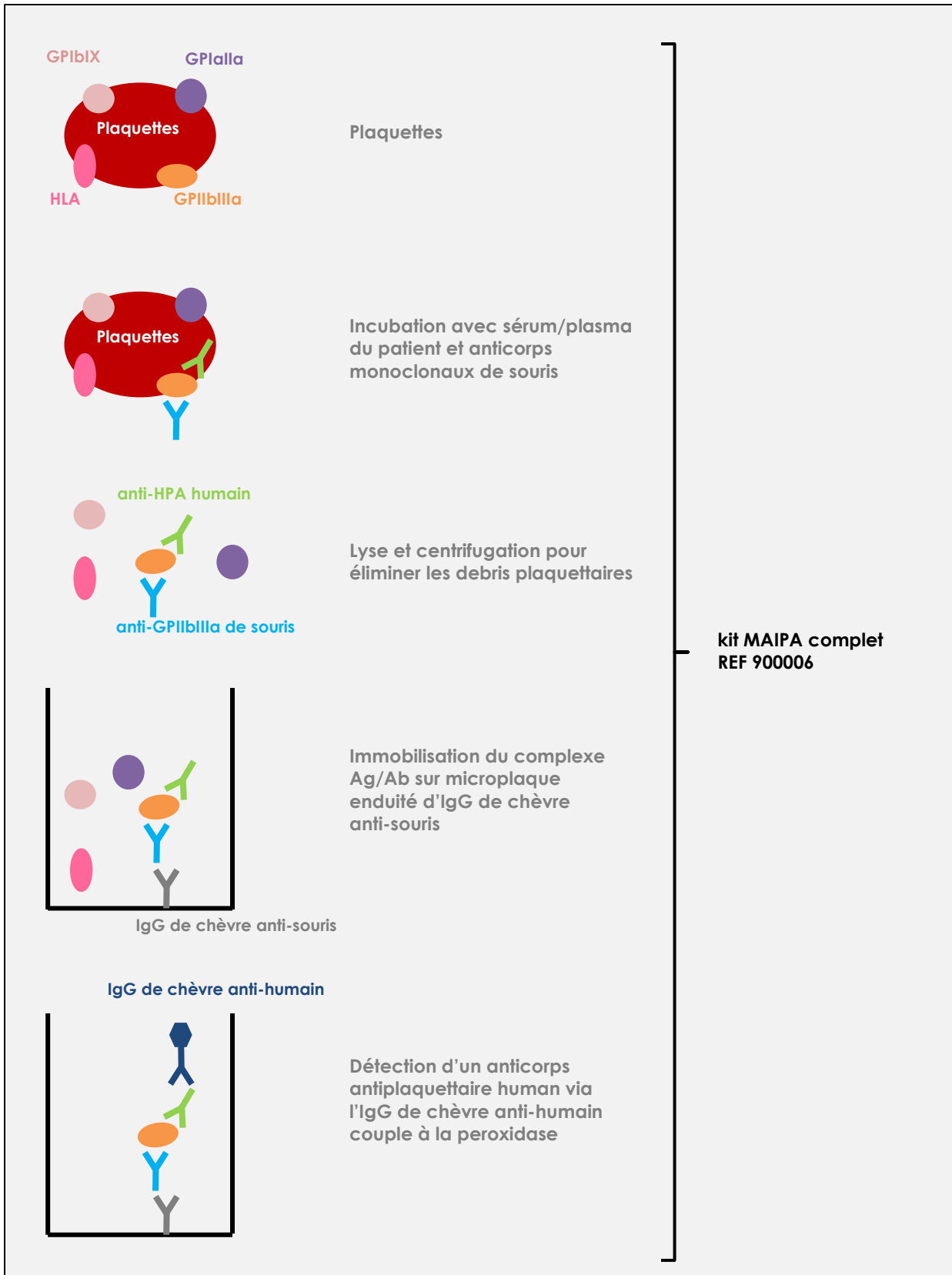
Les cellules de dépistage et les plaquettes d'identification du kit MAIPA ne permettent pas le dépistage et l'identification des anticorps dirigés contre les antigènes du système HPA-15. Ce groupe plaquettaire est indiqué à titre d'information seulement. Des plaquettes spécifiques sont nécessaires pour l'identification des anticorps anti-HPA-15a et anti-HPA-15b, ainsi qu'un anticorps monoclonal supplémentaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müller-Eckhardt C. *Blood*. 1987 Dec; 70(6):1722-6.
2. A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. Campbell K, Rishi K, Howkins G, Gilby D, Mushens R, Ghevaert C, Metcalfe P, Ouwehand WH, Lucas G. *Vox Sang*. 2007 Nov; 93(4):289-97.
3. Report on the 13th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. Foxcroft Z, Campbell K, Mérieux Y, Urbaniak S, Brierley M, Rigal D, Ouwehand WH, Metcalfe P. *Vox Sang*. 2007 Nov; 93(4):300-5.
4. The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet. Nguyen XD, Goebel M, Schober M, Klüter H, Panzer S. *Transfusion*. 2010 Jul; 50(7):1429-34. Epub 2010 Apr 23.
5. Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. Mérieux Y, Debost M, Bernaud J, Raffin A, Meyer F, Rigal D. *Pathol. Biol. (Paris)* 1997 Nov; 45(9):697-700.

ANNEXES

Principe du test MAIPA



Résumé concise de la procédure MAIPA

MAIPA indirect dépistage	MAIPA direct	MAIPA identification
50 µl plaquettes de dépistage	50 µl plaquettes du patient	50 µl plaquettes d'identification
3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm
laver 2x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	laver 2x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	laver 2x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm
50 µl sérum/plasma du patient	50 µl CELL WASH BUFFER 1x	50 µl sérum/plasma du patient
30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C
3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm
laver 2x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	laver 2x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	laver 2x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm
50 µl anticorps monoclonaux	50 µl anticorps monoclonaux	50 µl anticorps monoclonaux
30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C
3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm
laver 4x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	laver 4x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm	laver 4x: 200 µl CELL WASH BUFFER 1x 3 min. 1050 g (+/- 50 g) décanter agiter 2 x 10 sec. 700-1000 rpm
130 µl Tampon de lyse mélanger énergiquement en agitant par pipetages et refoulements	130 µl Tampon de lyse mélanger énergiquement en agitant par pipetages et refoulements	130 µl Tampon de lyse mélanger énergiquement en agitant par pipetages et refoulements
minimum 15 min. 2 - 8 °C	minimum 15 min. 2 - 8 °C	minimum 15 min. 2 - 8 °C
15 min. 1050 x g (+/- 50 g)	15 min. 1050 x g (+/- 50 g)	15 min. 1050 x g (+/- 50 g)
100 µl lysat vers microplaque coatée	100 µl lysat vers microplaque coatée	100 µl lysat vers microplaque coatée
30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C
laver 6x: 200 µl ELISA WASH BUFFER 1x vider les puits et tapoter sur papier absorbant	laver 6x: 200 µl ELISA WASH BUFFER 1x vider les puits et tapoter sur papier absorbant	laver 6x: 200 µl ELISA WASH BUFFER 1x vider les puits et tapoter sur papier absorbant
100 µl HRP conjugué	100 µl HRP conjugué	100 µl HRP conjugué
30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C	30 min. 36 ± 1 °C
laver 6x: 200 µl ELISA WASH BUFFER 1x vider les puits et tapoter sur papier absorbant	laver 6x: 200 µl ELISA WASH BUFFER 1x vider les puits et tapoter sur papier absorbant	laver 6x: 200 µl ELISA WASH BUFFER 1x vider les puits et tapoter sur papier absorbant
100 µl substrat TMB	100 µl substrat TMB	100 µl substrat TMB
15 min. 37°C	15 min. 37°C	15 min. 37°C
100 µl solution d'arrêt	100 µl solution d'arrêt	100 µl solution d'arrêt
lecture à 450/620 nm	lecture à 450/620 nm	lecture à 450/620 nm

Exemples de feuille de paillasse MAIPA

MAIPA – Feuille de paillasse: 5 patients dépistage direct & indirect

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANC	PLTL PATIENT 1 pas de sérum MAB IiBIIIa	PLTL PATIENT 2 pas de sérum MAB IiBIIIa	PLTL PATIENT 3 pas de sérum MAB IiBIIIa	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB IiBIIIa	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB IiBIIIa						
B	BLANC	PLTL PATIENT 1 pas de sérum MAB Ialla	PLTL PATIENT 2 pas de sérum MAB Ialla	PLTL PATIENT 3 pas de sérum MAB Ialla	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB Ialla	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB Ialla						
C	SCREEN PLTL CONTR 1a MAB IiBIIIa	PLTL PATIENT 1 pas de sérum MAB HLA	PLTL PATIENT 2 pas de sérum MAB HLA	PLTL PATIENT 3 pas de sérum MAB HLA	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB HLA	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB HLA						
D	SCREEN PLTL CONTR 5b MAB Ialla	PLTL PATIENT 1 pas de sérum MAB IbiX	PLTL PATIENT 2 pas de sérum MAB IbiX	PLTL PATIENT 3 pas de sérum MAB IbiX	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB IbiX	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB IbiX						
E	SCREEN PLTL CONTR HLA MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB IiBIIIa						
F	SCREEN PLTL CONTR NEG MAB IbiX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 1 MAB Ialla	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 2 MAB Ialla	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 3 MAB Ialla	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB Ialla	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
G		SCREEN PLTL SERUM PATIENT 1 MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 2 MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 3 MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB HLA						
H		SCREEN PLTL SERUM PATIENT 1 MAB IbiX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 2 MAB IbiX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 3 MAB IbiX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB IbiX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB IbiX						

MAIPA – Feuille de paillasse: 7 patients identification

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANC	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
B	BLANC	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
C	SCREEN PLTL CONTR 1a MAB IiBIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
D	SCREEN PLTL CONTR 5b MAB Ialla	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
E	SCREEN PLTL CONTR HLA MAB HLA	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
F	SCREEN PLTL CONTR NEG MAB IbiX	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 1 MAB IiBIIIa	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 2 MAB IiBIIIa	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 3 MAB IiBIIIa	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 4 MAB IiBIIIa	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 5 MAB Ialla						
G	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 6 MAB Ialla	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 6 MAB Ialla	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 6 MAB Ialla	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 6 MAB Ialla	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 6 MAB Ialla	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 6 MAB Ialla						
H	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 7 MAB Ialla	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 7 MAB Ialla	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 7 MAB Ialla	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 7 MAB Ialla	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 7 MAB Ialla	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 7 MAB Ialla						

MAIPA – Feuille de paillasse: 3 patients identification et 3 patients dépistage direct & indirect

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANC	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 1 MAB IIbIIIa	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 2 MAB IIbIIIa	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB IIbIIIa	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB IIbIIIa	PLTL PATIENT 6 pas de sérum MAB IIbIIIa						
B	BLANC	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 1 MAB IIbIIIa	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 2 MAB IIbIIIa	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB IaIIa	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB IaIIa	PLTL PATIENT 6 pas de sérum MAB IaIIa						
C	SCREEN PLTL CONTR 1a MAB IIbIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 1 MAB IIbIIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 2 MAB IIbIIIa	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB HLA	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB HLA	PLTL PATIENT 6 pas de sérum MAB HLA						
D	SCREEN PLTL CONTR 5b MAB IaIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 1 MAB IIbIIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 2 MAB IIbIIIa	PLTL PATIENT 4 pas de sérum MAB IbIX	PLTL PATIENT 5 pas de sérum MAB IbIX	PLTL PATIENT 6 pas de sérum MAB IbIX						
E	SCREEN PLTL CONTR HLA MAB HLA	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 1 MAB IIbIIIa	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 2 MAB IIbIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB IIbIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB IIbIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 6 MAB IIbIIIa						
F	SCREEN PLTL CONTR NEG MAB IbIX	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 1 MAB IIbIIIa	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 2 MAB IIbIIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB IaIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB IaIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 6 MAB IaIIa						
G	ID PLTL 1 SERUM PATIENT 3 MAB IaIIa	ID PLTL 3 SERUM PATIENT 3 MAB IaIIa	ID PLTL 5 SERUM PATIENT 3 MAB IaIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB HLA	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 6 MAB HLA						
H	ID PLTL 2 SERUM PATIENT 3 MAB IaIIa	ID PLTL 4 SERUM PATIENT 3 MAB IaIIa	ID PLTL 6 SERUM PATIENT 3 MAB IaIIa	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 4 MAB IbIX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 5 MAB IbIX	SCREEN PLTL SERUM PATIENT 6 MAB IbIX						

MAIPA Feuille de paillasse - Modèle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANC											
B	BLANC											
C	SCREEN PLTL CONTR 1a MAB IiBIIIa											
D	SCREEN PLTL CONTR 5b MAB IaIIa											
E	SCREEN PLTL CONTR HLA MAB HLA											
F	SCREEN PLTL CONTR NEG MAB IbIX											
G												
H												

Historique des révisions

Numéro de version	Description
IFU900006F/V10/11.12.2018	Version précédente.
IFU900006F/V11/11-2021	<p>Ajouts à la section « Avertissements et Précautions » (clauses 4.2, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.10, 4.11).</p> <p>Ajouts sur l'équipement requis, en particulier sur les centrifugeuses à la section 8.</p> <p>Restructuration des instructions de la procédure MAIPA :</p> <ul style="list-style-type: none">• Division en instructions séparées pour le MAIPA Indirect et MAIPA Direct• Inclusion d'une résumé concise de la procédure MAIPA complète en annexe. <p>Application du nom légal du fabricant: 'Advanced Practical Diagnostics BV' à la place de l'abréviation 'apDia'.</p>
IFU900006F/V12/02-2023	<p>Ajout à la sections 9 et 10 « Procédure de test MAIPA Indirect/Direct » (clauses 9.5 et 10.4) : pour la validation d'un test MAIPA, le témoin négatif peut être testé non seulement avec l'anticorps monoclonal de détection anti-GPIbIX, mais aussi avec l'anticorps anti-GPIIbIIIa ou anti-GPIIaIIa.</p>