

PAK[®]12G

UTILIZAÇÃO

PAK[®]12G é um imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para detectar IgG anticorpos para antígenos HLA classe I e para epitopos das glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa, Ia/IIa, and Ib/IX.

Para Diagnostico *In Vitro*.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

A existência de antígenos específicos de plaquetas em várias glicoproteínas plaquetárias tem sido descrita por muitos investigadores.^{1,2,3,4,5,6} Os anticorpos para antígenos específicos de plaquetas ou HLA class I devidos a gravidez ou transfusão podem resultar na imuno-destruição das plaquetas transfundidas.^{7,8,9} A confirmação da presença destes anticorpos em soros de doentes pode ser útil na procura de produtos sanguíneos potencialmente compatíveis.

Os micropoços do ELISA de fase sólida PAK[®]12G fornecem glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa e Ia/IIa capturadas por anticorpo monoclonal obtidas a partir de três doadores do grupo O de tipo plaquetário conhecido. O HLA classe I e a glicoproteína plaquetária Ib/IX são fornecidas como glicoproteínas purificadas por afinidade. O teste é concebido para detectar e diferenciar entre anticorpos para antígenos HLA classe I e antígenos específicos de plaquetas. A configuração dos poços pode ser encontrada na Folha de Registro.

PRINCÍPIO

O soro ou plasma do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com glicoproteínas plaquetárias e HLA permitindo que os anticorpos, se presentes, se liguem. Os anticorpos não ligados são então lavados. Adiciona-se uma globulina anti-humana marcada com fosfatase alcalina (Anti-IgG) aos poços e incuba-se. O material não ligado Anti-IgG é lavado e adiciona-se o substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Após o período de incubação de 30 minutos, a reacção é parada com uma solução de hidróxido de sódio. A densidade óptica da cor que se desenvolve é medida num espectofotómetro.

REAGENTES

Número máximo de testes por kit: 5

Todos os reagentes devem ser armazenados como indicado nos respectivos rótulos.

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Micropoços: tiras micropoços de base achatada aos quais foram imobilizadas glicoproteínas plaquetárias e HLA. As tiras de micropoços encontram-se em sacos de alumínio resseláveis. Prontos a usar. |
| TCW | 2. Solução de Lavagem Concentrada (10x): Solução Tris (hydroxymethyl aminomethane) tamponada com cloreto de sódio e Tween 20. 1% de azida sódica. Diluir com água desionizada ou destilada antes de usar. Armazenar a Solução de Lavagem de Trabalho até 48 horas à temperatura ambiente ou até sete dias a 2 – 8°C. |
| SD | 3. Diluente de Amostra: Solução Fosfato tamponada contendo albumina bovina e soro de ratinho. Azida sódica 0.1%. Pronto a usar. |
| SB | 4. Tampão Substrato: Esta solução contém dietanolamina e cloreto de magnésio. Azida sódica 0.02%. Pronto a usar. Proteger da luz. |
| SS | 5. Solução de Paragem: Hidróxido de sódio 3 M. Pronta a usar. Utilizar com cuidado. |
| AG | 6. Conjugado: anticorpo de cabra purificado por afinidade conjugado a fosfatase alcalina para a imunoglobulina humana G (IgG). Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |

- | | |
|-----------|---|
| PN | 7. Substrato PNPP (p-nitrophenil fosfato): Pó cristalino. Reconstituir com água desionizada ou destilada e diluir em Tampão Substrato antes de usar. Proteger da luz. |
| PC | 8. Soro Controlo Positivo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |
| NC | 9. Soro Controlo Negativo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |
| PS | 10. Seladores de placas. |

PRECAUCÕES

- Não usar reagentes turvos ou contaminados.
- Tem de se ter cuidado para evitar a contaminação do Diluente de Amostra e Conjugado. A contaminação inadvertida destes reagentes com soro humano ou plasma resulta na neutralização do Conjugado e subsequentemente ausência de resultados válidos.
- Não utilizar os reagentes para além da sua data de validade.
- Os micropoços e reagentes contidos no kit não devem ser usados com qualquer outro tipo de teste.
- A substituição dos componentes por outros que não sejam fornecidos no kit pode conduzir a resultados inconsistentes ou errados.
- Deitar fora quaisquer porções não usadas de Conjugado diluído, Controlos Positivo e Negativo diluídos e PNPP reconstituído e diluído após cada ensaio.
- Ao fazer as diluições, seguir as instruções do produtor das pipetas para uma dispensação e técnica de lavagem apropriadas.
- A reacção do substrato enzimático que ocorre na incubação final é sensível à temperatura e deve ser efectuada numa área controlada a 22 – 25°C.
- Devido às variações nos instrumentos ou temperaturas ambiente consistentemente variáveis pode ser necessário ao laboratório estabelecer um tempo de incubação ligeiramente superior ou inferior para atingir resultados controlo consistentemente válidos. Porque a temperatura da incubação final pode afectar os valores controlo, é importante monitorizar periodicamente a incubação à temperatura ambiente.

ATENÇÃO

- Todo o soro humano utilizado nos Controlos Positivo e Negativo foi testado e considerado negativo para anticorpos para VIH, VHC e HbsAg por métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método pode oferecer garantia completa da ausência de VIH, vírus da Hepatite C, vírus da Hepatite B ou outros agentes infecciosos. Assim, estes materiais devem ser manuseados como potencialmente infecciosos.
- Alguns dos reagentes fornecidos com este kit contêm azida sódica como conservante.
AVISO: A azida sódica reage com chumbo e cobre formando azidas de metal altamente explosivas. Ao deitá-la numa pia esta deve ser imediatamente lavada com uma grande quantidade de água para evitar a produção de azida. A azida sódica é um veneno e é tóxica se ingerida.
- A Solução de Paragem (NaOH) é corrosiva. Evitar o contacto com os olhos e pele. Derrames devem ser imediatamente limpos.
- Deitar fora todos os componentes, quando usados, de acordo com os regulamentos locais.

COLHEITA DA AMOSTRA

O sangue deve ser colhido em ACD ou EDTA (plasma) ou sem anticoagulante (soro) usando técnicas assépticas e deve ser testado enquanto fresco para minimizar a probabilidade de obter reacções falso positivas ou falso negativas devido a armazenamento impróprio ou contaminação da amostra. As amostras que não possam ser testadas imediatamente devem ser armazenadas a 2 – 8°C por um máximo de 48 horas ou congeladas. As amostras congeladas a –20°C ou menos mantêm-se em boas condições durante vários anos (2-3 anos). Contudo, para evitar qualquer deterioração ou ciclos repetidos de congelamento/descongelamento recomenda-se que as amostras sejam alíquotadas em pequenos volumes e então congeladas.

O soro ou plasma deve ser separado dos eritrócitos ao ser armazenado ou transportado.

Partículas ou agregados na amostra podem causar resultados falso-positivos ou fracos valores em duplicado. As amostras com este tipo de material devem ser centrifugadas antes de serem testadas.

Para este teste apenas é adequado soro de sangue total ou plasma. A diluição prévia das amostras em algo que não soro humano negativo ELISA normal pode afectar os resultados

Amostras contaminadas, hemolizadas, lipémicas, icterícias ou inactivadas por calor podem dar resultados inconsistentes e devem ser evitadas.

PROCEDIMENTO

Material Fornecido:

Os frascos podem conter mais reagente do que o descrito nas etiquetas. Assegure-se da correcta medição dos reagentes através da utilização de um dispositivo apropriado, quando fizer as diluições.

1. 6 – 2 x 8 Micropoço Tiras com suporte
2. 1 x 50 mL Solução de Lavagem Concentrada
3. 1 x 14 mL Diluente de Amostra
4. 1 x 14 mL Tampão Substrato
5. 1 x 14 mL Solução de Paragem
6. 1 x 80 µL Conjugado IgG Anti-Humano
7. 3 x 50 mg Substrato PNPP
8. 1 x 0.3 mL Soro Controlo Positivo
9. 1 x 0.7 mL Soro Controlo Negativo
10. 6 Seladores de Placa

Material Adicional Necessário:

1. Tubos teste para as diluições das amostras, controlos e reagentes
2. Pipetas para transferência
3. Micropipetas ajustáveis a volumes 10 – 100 µL e 100 – 1,000 µL e pontas descartáveis
4. Cronómetro
5. Leitor de microplaca com capacidade de leitura na gama de DO de 405 ou 410 e 490 nm
6. Água desionizada ou destilada
7. Papel absorvente
8. Lavador ou dispositivo de lavagem de microplaca
9. Centrífuga com capacidade de separar soro ou plasma de amostras de pacientes
10. Incubadora ou banho a 37°C

Procedimento do Teste

1. Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente
2. Preparar a Solução de Lavagem de trabalho diluindo a Solução de Lavagem Concentrada. Adicionar 1 volume de Solução de lavagem Concentrada a 9 volumes de água desionizada ou destilada. Misturar bem.
3. Determinar o número de amostras a testar. Utilizar a Folha de Registo para designar cada amostra a uma localização de duas colunas (duplicado).

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRA E CONTROLOS

4. Diluir da seguinte forma e misturar bem:

| | Volume de Diluente de Amostra | Volume de Amostra |
|---------|-------------------------------|-------------------|
| PC | 150 µL | 50 µL |
| NC | 600 µL | 200 µL |
| Amostra | 600 µL | 200 µL |

5. Remover os micropoços suporte do saco. Reselar as tiras que não forem necessárias no saco de protecção.

NOTA: O kit apenas fornece um suporte. Não deitar fora até todas as tiras terem sido utilizadas.

NOTA: Oriente o suporte com o A1 no canto superior esquerdo. Assegure-se que todas as tiras estão correctamente encaixadas no seu suporte. Marque ou numere cada tira para evitar erros.

6. Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho a todos os poços e deixar 5-10 minutos à temperatura ambiente.

7. Aspirar ou decantar vigorosamente e inverter em papel absorvente para evitar a secagem.

8. Adicionar 50 µL do controlo ou amostra apropriados aos poços como estabelecido na Folha de Registo.

NOTA: Não adicionar amostras ou reagentes aos poços branco.

NOTA: Se forem testadas múltiplas amostras em simultâneo (é apenas necessário um conjunto de controlos) IDENTIFICAR CADA TIRA PARA EVITAR ERROS.

9. Selar os micropoços com o selador de placa e incubar 30-35 minutos num banho a 37°C. Se for utilizada uma câmara incubadora aumentar o tempo em 10 minutos

10. Diluir o Conjugado 1:100 em Diluente de Amostra. Utilizar um recipiente de polipropileno

| | | |
|--------|-----------|-----------|
| Tiras: | 2 – 2 x 8 | 6 – 2 x 8 |
| AG | 20 µL | 60 µL |
| SD | 2.0 mL | 6.0 mL |

NOTA: O conjugado é viscoso. Colocar a ponta 2-3 vezes no Conjugado antes de dispensar e enxaguar após a adição ao Diluente de Amostra. Misturar bem.

11. LAVAGEM:

- Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
- Aspirar or decantar.
- Repetir os passos b + c para um total de 3 ou 4 lavagens.
- Decantar vigorosamente para remover qualquer Solução de Lavagem residual. Inverter em papel absorvente para evitar a secagem.

NOTA: É importante remover completamente toda a Solução de Lavagem após a última lavagem.

12. Adicionar 50 µL de Conjugado diluído (feito num passo anterior) a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.

13. Selar os micropoços com o selador de placa e incubar 30-35 minutos num banho a 37°C. Se for utilizada uma câmara incubadora aumentar o tempo em 10 minutos.

14. Dissolver o Substrato PNPP adicionando ao frasco 0.5 mL de água desionizada ou destilada. Fechar o frasco e misturar bem. Proteger da luz até ser utilizado.

15. Diluir o PNPP 1:100 em Tampão Substrato.

| | | |
|--------|-----------|-----------|
| Tiras: | 2 – 2 x 8 | 6 – 2 x 8 |
| PN | 40 µL | 120 µL |
| SB | 4.0 mL | 12.0 mL |

Misturar bem. Proteger da luz até ser utilizado.

16. LAVAGEM:

- Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
- Aspirar or decantar.
- Repetir os passos b + c para um total de 3 ou 4 lavagens.
- Decantar vigorosamente para remover qualquer Solução de Lavagem residual. Inverter em papel absorvente para evitar a secagem.

Prosseguir rapidamente com os próximos três passos

17. Adicionar 100 µL da solução PNPP diluída a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.

18. Manter os micropoços no escuro durante 30 minutos à TEMPERATURA AMBIENTE (22 – 25°C).

NOTA: O tempo de incubação e a temperatura após a adição do PNPP é crítico. NÃO alterar o tempo de incubação estabelecido ou a temperatura. Para a consistência dos resultados, começar a contar o tempo logo após a adição do reagente ao primeiro poço.

19. Parar a reacção adicionando 100 µL de Solução de Paragem a cada poço na mesma sequência que foi adicionado o substrato. Adicionar 200 µL de Solução de Paragem aos poços branco.

20. Ler a absorvância (DO) de cada poço 405 or 410 nm usando um filtro de referência de 490 nm. Se os resultados não puderem ser lidos imediatamente, colocar os poços no escuro até 30 minutos.

21. Subtrair os valores obtidos nos poços branco a todos os outros poços, amostras e controlos. Muitos leitores ELISA estão programados para efectuar este passo automaticamente.

22. Registrar os resultados na Folha de Registo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade PAK[®] 12G é efectuado no sistema pela inclusão dos Controlos Positivo e Negativo. Estes controlos devem ser incluídos em cada teste ensaio para ajudar a determinar se ocorreram erros técnicos ou falha de reagentes.

Crítérios para um teste válido:

| | Controlo Negativo | Controlo Positivo |
|----------|---------------------|-------------------|
| DO média | ≤ 0.150 (HLA linha) | ≥ 2.000 |

As DO obtidas de testes em duplicado devem estar entre 20% da média dos dois valores. Amostras cujos resultados não estejam neste limite devem ser testadas novamente.

NOTA: Duplicados fracos podem resultar de falta de reagente ou amostra, adição irregular de reagentes, temperaturas de incubação irregulares, exposição à luz na incubação final ou contaminação entre poços. Não testar em duplicado pode conduzir à aceitação de resultados errados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados com valores de DO iguais ou maiores que 2X o valor obtido da media dos controlos negativos da glicoproteína correspondente (2 valores de controlo negativo para cada glicoproteína) são considerados como resultados positivos

LIMITAÇÕES

Resultados errados podem ser consequência de contaminação bacteriana dos materiais do teste, períodos de incubação não adequados, lavagem ou decantação dos poços não adequadas, exposição do substrato à luz, omissão de reagente, exposição a temperaturas superiores ou inferiores às requeridas, ou omissão de passos.

A presença de imuno complexos ou outros agregados de imunoglobulinas na amostra podem causar uma ligação não-específica aumentada e produzir falso-positivos neste ensaio.

Os resultados que não se encaixarem numa especificidade de aloanticorpos são considerados indeterminados. Estas amostras podem ser reintroduzidas e/ou retestadas, ou testadas por outro método como o GTI MACE[®] ou MAIPA.

Os resultados deste ensaio não devem ser utilizados como única base para uma decisão clínica.

Alguns anticorpos de baixo título e de baixa avidéz podem não ser detectados com este ensaio.

Este produto não detecta anticorpos IgM ou IgA.

Os anticorpos para antígenos específicos de plaquetas que não estão representados na Folha de Registo podem não ser detectados.

A presença de outros antígenos específicos de plaquetas localizados em GPIIb/IIIa como HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) e HPA-8b (Sr^a) não foi determinada para as plaquetas capturadas nos poços GPIIb/IIIa. É possível que aloanticorpos para estes sistemas possam ser reactivos com este ensaio.

Anticorpos para antígenos HLA classe I de baixa incidência podem não ser detectados com este produto.

Alguns anticorpos HLA não citotóxicos que não reagem no ensaio de linfocitotoxicidade (LCA) podem ser detectados por esta técnica.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

Quando armazenado convenientemente e utilizado de acordo com os procedimentos descritos acima, este produto pode detectar anticorpos (IgG) para antígenos HLA classe I e antígenos específicos de plaquetas identificados na Ficha de Registo.

Para assegurar uma reactividade e especificidade adequadas, cada lote de PAK[®] 12G é testado antes de ser colocado no mercado, com amostras que contém anticorpos reactivos com as glicoproteínas identificadas na Folha de Registo incluída bem como amostras sem tais anticorpos.

Avaliação de Performance

Método Comparativo

| PAK [®] 12G | | Método Comparativo | | Total |
|----------------------|----------|--------------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | |
| PAK [®] 12G | Positivo | 97 | 5 | 102 |
| | Negativo | 13* | 266 | 279 |
| | Total | 110 | 271 | 381 |

Concordância: 95.3%

Co-positividade: 88.2% Co-negatividade: 98.2%

Método Comparativo: RPHA= Ensaio de Hemaglutinação Passiva Reversa

* Como o método comparativo incorpora plaquetas totais intactas como alvo para a detecção dos anticorpos, pode originar resultados positivos com qualquer antígeno expresso nas plaquetas.¹⁰ Os alvos para a detecção de anticorpos PAK[®] 12G são as glicoproteínas individuais e, assim, não detectam aglutininas frias ou anticorpos para antígenos dos eritrócitos como Lewis.

REFERÊNCIAS

1. Kunicki TJ, Aster RH: Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen Pl(A1). Mol Immunol 1979; 16:353.
2. Van der Schoot, et al. Characterization of platelet-specific alloantigens by Immunoblotting: localization of Zw and Bak antigens. Brit. J. Haemat. 1986; 64:715-723.
3. Kuijpers, R. W. A. M. et al. Localization of the platelet-specific Ko-system antigen Ko^a/Ko^b in GP Ib/IX. Blood 1989; 74: Suppl. I, 226a.
4. Kieffer, N. et al. Immunochemical characterization of the platelet-specific alloantigen Lek^a, a comparative study with the Pl^{A1} alloantigen. Blood 1984; 64: 1212-1219.
5. Furihata, K. et al. On the association of platelet-specific alloantigen with glycoprotein IIIa. J. Clin. Invest. 1987; 80:1624-1630.
6. Kiefel, V. et al. The Br(a)/Br(b) alloantigen systems on platelets. Blood 1989; 73:2219-2223.
7. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunization to platelets. Transfusion 1978; 18:496.
8. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. Blood 1981; 57:395.
9. Schiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar on antigens on blood cells and body fluids. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980; 189-208.
10. Garratty G. Review: Platelet immunology – similarities and differences with red cell immunology, 1995. Immunohematology 11 No 4: 113-4.

U.S. Patent #5,514,557



GTi DIAGNOSTICS

Good science starts with people.™

PAK[®]12G

- PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- ARMAZENAR A 2-8°C

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



REF PAK12G

Rev. 2007-07-10 (P)

EC REP

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

www.gtidiagnostics.com