

UTILIZAÇÃO

PAKAUTO® é um imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para detectar autoanticorpos plaquetários eluídos de plaquetas de doentes ou em circulação no soro ou plasma de doentes.

Para Diagnostico *In Vitro*.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

A Púrpura Trombocitopénica Autoimune (AITP) é uma das causas mais comuns de trombocitopenia imune. Cerca de metade dos casos de AITP ocorrem em associação com outras situações como linfomas, lupus eritematoso sistémico (LES) e infecção VIH; os casos restantes são considerados “idiopáticos” Com base na apresentação clínica a AITP pode ser classificada em dois tipos: AITP aguda, uma desordem infantil geralmente auto-limitada, e AITP crónica que ocorre em adultos e que raramente cede espontaneamente.

A maioria dos anticorpos associados com AITP reconhecem glicoproteínas de membrana plaquetárias, especialmente GPIIb/IIIa, GPIb/IX, e GPIa/IIa.^{1,2} Os anticorpos reactivos com estes alvos podem ser frequentemente detectados em plasma de doentes com AITP,^{1,2,3,4,5} mas é preferível caracterizar as imunoglobulinas associadas às plaquetas para confirmar a auto-reatividade. Muitos testes para identificação de imunoglobulinas associadas às plaquetas falham na especificidade já que frequentemente se observam resultados positivos em doentes com tipos de trombocitopenia não imunes.²

Os micropoços do ELISA de fase sólida PAKAUTO® contêm glicoproteínas Iib/IIIa, Ib/IX, e Ia/IIa capturadas por anticorpo monoclonal. O ensaio é concebido para detectar autoanticorpos específicos de glicoproteínas plaquetárias em soro ou plasma de doentes, ou eluatos da superfície das suas plaquetas.

PRINCÍPIO

O soro, plasma, ou eluato do doente é adicionado a micropoços revestidos com glicoproteínas plaquetárias permitindo que o anticorpo, se presente, se ligue. Os anticorpos não ligados são então lavados. Adiciona-se uma globulina anti-humana marcada com fosfatase alcalina (Anti-IgG/A/M) aos poços e incuba-se. O material não ligado Anti-IgG/A/M 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 de micropoços de base achatada ao qual foram imobilizados glicoproteínas plaquetárias Iib/IIIa, Ib/IX, e Ia/IIa. As tiras de micropoços estão fechadas num saco de alumínio reselável. 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 temperature ambiente ou até sete dias a 2 – 8°C. |
| SD | 3. Diluente de Amostra: Solução salina 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. |
| AH | 6. Conjugado: anticorpo de cabra purificado por afinidade conjugado a fosfatase alcalina para a imunoglobulina humana (IgG/A/M). Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |

- | | |
|------------|---|
| CRP | 7. Solução de Resuspensão Celular e Conservante: Solução salina Fosfato tamponada contendo EDTA. Azida sódica 0.1%. Pronto a usar. |
| BS | 8. Solução Tamponizante: solução Tris contendo albumina bovina. |
| ES | 9. Solução de Eluição: Tampão glicina de baixo pH. |
| PN | 10. 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 | 11. Soro Controlo Positivo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |
| NC | 12. Soro Controlo Negativo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |
| PCP | 13. Controlo Plaquetário Positivo (Controlo Eluato Positivo): Plaquetas humanas revestidas com anticorpos secas em vácuo. Re-hidratar antes de usar com Solução de Resuspensão Celular e Conservante. |
| NCP | 14. Controlo Plaquetário Normal (Controlo Eluato Negativo): Plaquetas humanas secas em vácuo. Re-hidratar antes de usar com Solução de Resuspensão Celular e Conservante. |
| PS | 15. 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 componetes 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 EDTA (plasma, plaquetas) ou sem anticoagulante (soro) usando técnicas assépticas e deve ser testado enquanto fresco para minimizar as hipóteses de obtenção de reacções falso positivas ou falso negativas devido a armazenamento impróprio ou contaminação da amostra. Soro ou plasma que não possam ser testados imediatamente devem ser armazenados a 2-8°C por não mais que 48 horas ou congelados. As amostras congeladas a -20°C ou menos mantêm-se em boas condições durante vários anos (2-3 anos). Contudo, para evitar qualquer deteriorização ou ciclos repetidos de congelamento/descongelamento recomenda-se que as amostras sejam aliqüotadas em pequenos volumes e então congeladas.

O soro ou plasma devem ser separados dos eritrócitos quando armazenados ou transportados.

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.

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

Para a preparação dos eluatos plaquetários é necessário um mínimo de 1×10^7 plaquetas (o ideal serão 5×10^7 plaquetas). Pode ser obtida amostra suficiente de doentes com contagens plaquetárias $\geq 10,000/\mu\text{L}$ colhendo dois tubos de 7 mL de sangue total.

NOTA: O transporte das amostras sanguíneas pode causar redução das plaquetas. Se as amostras necessitarem de ser transportadas é preferível fazer a colheita de uma quantidade maior de amostra para assegurar as plaquetas adequadas para a eluição.

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 Tiras de Micropoço 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/A/M Anti-Humano
7. 1 x 50 mL Solução de Resuspensão Celular e Conservante
8. 1 x 2.5 mL Solução Tamponizante
9. 1 x 2.5 mL Solução de Eluição
10. 3 x 50 mg Substrato PNPP
11. 1 x 0.3 mL Soro Controlo Positivo
12. 1 x 0.7 mL Soro Controlo Negativo
13. 1 Controlo Plaquetário Positivo (Controlo Eluato Positivo)
14. 1 Controlo Plaquetário Normal (Controlo Eluato Negativo)
15. 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. Relógio
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
11. Tubos de microcentrifuga
12. Microcentrifuga para as plaquetas
13. Plaquetas normais (5×10^7) para controlo da eluição

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 serem testadas. Com a Folha de Registo identificar cada amostra numa coluna. Registrar a identificação de cada amostra na Folha de Registo.

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	300 µL	100 µL
Amostra	300 µL	100 µL

5. Preparar os botões de plaquetas a partir das plaquetas do doente ou do dador normal da seguinte forma:
 - a) Preparar plasma rico em plaquetas (PRP) centrifugando amostras sanguíneas com EDTA a 110 – 150 rcf durante 10 – 15 minutos.
 - b) Transferir o PRP para um tubo de polipropileno limpo e centrifugar a 10,600 rcf durante 5 – 10 minutos para obter um botão de plaquetas. Remover o plasma.
 - c) Adicionar 500 µL de CRP ao botão de plaquetas e misturar suavemente com uma pipeta. Transferir a suspensão de plaquetas pra um tubo e lavar três vezes com pelo menos 500 µL de Solução de Resuspensão e Conservação Celular (CRP).
 - d) Após a ultima lavagem, preparar um botão de plaquetas que contenha entre 1 e 5×10^7 plaquetas. Isto pode ser feito resuspendendo as plaquetas com CRP e ajustando a contagem plaquetária a 10 – 50,000 plaquetas por µL. Transferir 1 mL para um tubo e centrifugar durante 5 minutos a 10,600 rcf. (Como alternativa, um botão de 5-10 µL de plaquetas deve conter plaquetas suficientes para fazer a eluição. Comparar o botão a um tubo identico com 5-10 µL de Diluente de Amostra.)
6. Preparar os botões de plaquetas controlo.
 - a) Adicionar 500 µL de Solução de Resuspensão e Conservação Celular ao Controlo Plaquetário Positivo (Controlo Eluato Positivo) e, se necessário, ao Controlo Plaquetário Normal (Controlo Eluato Negativo). Deixar à temperatura ambiente durante pelo menos 10 minutos para re-hidratar. Misturar cuidadosamente para resuspender e centrifugar a 10,600 rcf durante 5 - 10 minutos. Decantar or aspirar o sobrenadante e blot o tampão restante para obter um botão de plaquetas seco.

Nota: É preferível usar plaquetas normais frescas para o Controlo Eluato Negativo mas são fornecidas plaquetas secas para quando não há plaquetas normais disponíveis.

7. Preparar os eluatos:
 - a) Antes de iniciar, certificar-se que todos os botões de plaquetas estão bem sedimentados e que toda a CRP é removida.
 - b) Adicionar 180 µL de Solução de Eluição a cada botão de plaquetas e misturar com o auxílio de uma pipeta. Deixar a mistura à temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugar a 10,600 rcf durante 5 - 10 minutos.

c) Transferir imediatamente o sobrenadante (eluatos) para um tubo limpo e adicionar 180 µL de Solução Tamponizante a cada tubo. Misturar cuidadosamente. Centrifugar a 10,600 rcf durante 10 minutos para remover quaisquer debris de plaquetas.

8. Testar imediatamente ou congelar para futuros testes. Os eluatos de plaquetas podem ser congelados a t -80°C.

NOTA: Não diluir os eluatos.

9. Remover o suporte de micropoços do saco. Remover rapidamente e reselar as tiras não usadas no saco de protecção.

NOTA: É apenas fornecido um suporte no kit. Não deitar fora antes de 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.

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

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

12. Adicionar 50 µL do eluato ou controlo ou amostra apropriados aos poços de uma coluna como mostrado na Figura 1.

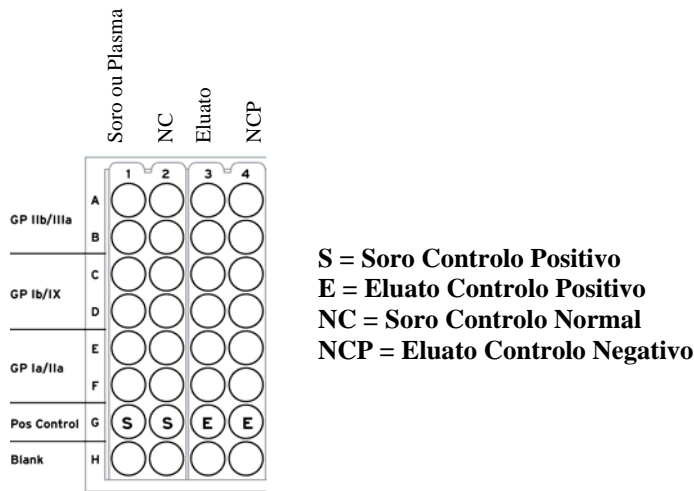


Fig. 1

NOTA: Não adicionar amostras ou reagentes aos poços branco.

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

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

Tiras:	2 - 2 x 8	6 - 2 x 8
AH	20 µL	60 µL
SD	2.0 mL	6.0 mL

NOTE: 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.

15. LAVAGEM:

- a) Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- b) Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
- c) Aspirar or decantar.
- d) Repetir os passos b + c para um total de 3 ou 4 lavagens.
- e) 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.

16. Adicionar 50 µL de Conjugado diluído (feito num passo anterior) a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. LAVAGEM:

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

Prosseguir rapidamente com os próximos três passos.

21. Adicionar 100 µL da solução PNPP diluída a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.
22. 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.

23. 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.
24. Ler a absorvância (DO) de cada poço a 405 ou 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.
25. 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.
26. Registrar os resultados na Folha de Registo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade PAKAUTO[®] 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.

Critérios para um teste válido:

	Controlo Negativo	Controlo Positivo
Eluato	≤ 0.100 (IIb/IIIa linha)	≥ 1.000
Soro	≤ 0.160 (IIb/IIIa linha)	≥ 1.000

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, plaquetas insuficientes ou em excesso, 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 resultados falso-positivos neste ensaio.

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 é especificamente concebido para detectar autoanticorpos eluídos de plaquetas de doentes. Assim, uma reacção positiva obtida apenas com soro ou plasma do doente não indica necessariamente a presença de autoanticorpos. Os aloanticorpos específicos das plaquetas também podem ser reactivos usando este ensaio.

PAKAUTO[®] é concebido para detectar anticorpos reactivos com as glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa, Ib/IX, e Ia/IIa. Não é esperado que autoanticorpos de outras proteínas plaquetárias reajam neste ensaio.

É possível que um autoanticorpo possa dar um resultado falso negativo neste ensaio devido ao atraso espacial dos autoanticorpos humanos causado pelos anticorpos monoclonais de murino utilizados para capturar as glicoproteínas plaquetárias.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

Quando armazenado convenientemente e utilizado de acordo com os procedimentos descritos acima, este produto pode detectar autoanticorpos para glicoproteínas plaquetárias.

De forma a assegurar uma reactividade e especificidade adequadas, cada lote de PAKAUTO[®] é testado previamente com amostras que se sabe possuem autoanticorpos ou aloanticorpos reactivos com as glicoproteínas identificadas na Ficha de Registo incluída bem como amostras que não tenham tais anticorpos.

Avaliação de Performance

Método Comparativo

PAKAUTO®		Método Comparativo		Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	24	1	25
	Negativo	23	49	72
	Total	47	50	97

Concordância: 75.3%

Co-positividade: 51.1% Co-negatividade: 98%

Método Comparativo: PAIgG = IgG Associada a Plaquetas* (Citometria de Fluxo)
*PAIgG tem um baixo valor predictivo positivo para ITP.^{6,7}

REFERÊNCIAS

1. George JN, El-Harake MA, Raskob GE: N. Engl J. Med 331:1207, 1994.
2. George JN, El-Harake MA, Aster RH: Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms. In Williams Hematology, E Boytler, et al., eds, 5th ed, McGraw-Hill, 1995, p 1315.
3. Bussel JP, Schreiber AD: Immune thrombocytopenic purpura. In Hematology: Basic Principles and Practice, R. Hoffman, et al., eds, Churchill Livingstone, Inc., New York, 1991, p 1485.
4. McMillan R, Imback PA: Immune thrombocytopenic purpura. In Thrombosis and Hemorrhage, J. Loscalzo and Al Schafer, eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994, p 575.
5. Aster RH: The immunologic thrombocytopenias. In Platelet Immunology, TJ Kunicki, JN George, eds, Lipincott, Philadelphia, 1989, p 387.
6. Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ: A Prospective Study of the Usefulness of the Measurement of Platelet-Associated IgG for the Diagnosis of Idiopathic Thrombocytopenia Purpura. Blood 1982; 60 No.4: 1050.
7. McMillan R, et.al. Platelet associated and Plasma Anti-Glycoprotein Autoantibodies in Chronic ITP. Blood, 1987; 70 No.4: 1040.

U.S. Patent #5,514,557



GTi DIAGNOSTICS®

Good science starts with people.®

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



REF PAKAUTO

Rev. 2007-08-08 (P)



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

www.gtidiagnostics.com