

# B-SCREEN®

## UTILIZAÇÃO

B-SCREEN® é um imunoensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para detectar anticorpos IgG para antígenos HLA classe II.

Para Diagnostico *In Vitro*.

## SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

HLA é o principal sistema antigénico na determinação da sobrevivência de enxertos transplantados ou plaquetas transfundidas em indivíduos sensibilizados.<sup>1</sup> Os anticorpos HLA podem ser adquiridos através de alloimunização como resultado de uma gravidez, transfusão de produtos sanguíneos, ou transplantes prévios. Em geral, a alloimunização leva à produção de anticorpos HLA em cerca de 33% de indivíduos expostos.<sup>2</sup>

O ELISA de fase sólida B-SCREEN® fornece glicoproteínas HLA classe II purificadas por afinidade, obtidas de linhas celulares de linfócitos B transformados de EBV. Os linfócitos são cuidadosamente escolhidos para fornecer uma vasta gama de antígenos HLA classe II.

## PRINCÍPIO

O soro do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com glicoproteínas HLA classe II purificadas por afinidade 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) aos poços e incuba-se. O material anti-IgG não ligado 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 espectrofotómetro.

## REAGENTES

Número máximo de testes por kit: 44

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

- |            |  |
|------------|--|
| <b>MS</b>  | 1. Micropoços: tiras de micropoços de base achatada aos quais foram imobilizadas glicoproteínas HLA classe II purificadas por afinidade. As tiras de micropoços estão fechadas num saco de alumínio resselável. Prontos a usar.  |
| <b>TCW</b> | 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. |
| <b>SD</b>  | 3. Diluente de Amostra: Solução Fosfato tamponada contendo albumina bovina e soro de ratinho. Azida sódica 0.1%. Pronto a usar.  |
| <b>SB</b>  | 4. Tampão Substrato: Esta solução contém dietanolamina e cloreto de magnésio. Azida sódica 0.02%. Pronto a usar. Proteger da luz.  |
| <b>SS</b>  | 5. Solução de Paragem: Hidróxido de sódio 3 M. Pronta a usar. Utilizar com cuidado.  |
| <b>AG</b>  | 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.   |
| <b>PN</b>  | 7. Substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato): Pó cristalino. Reconstituir com água desionizada ou destilada e diluir em Tampão Substrato antes de usar. Proteger da luz.   |
| <b>PC</b>  | 8. Soro Controlo Positivo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar.  |
| <b>NC</b>  | 9. Soro Controlo Negativo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar.  |

## **PRECAUÇÕES**

- 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 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 sem anticoagulante 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 aliquotadas em pequenos volumes e então congeladas.

O soro deve ser separado dos eritrócitos quando 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. 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.

- 12- 1 x 8 Micropoço Tiras com suporte
- 1 x 50 mL Solução de Lavagem Concentrada
- 1 x 14 mL Diluente de Amostra
- 1 x 14 mL Tampão Substrato
- 1 x 14 mL Solução de Paragem
- 1 x 80 µL Conjugado IgG Anti-Humano
- 6 x 50 mg Substrato PNPP
- 1 x 0.45 mL Soro Controlo Positivo
- 1 x 0.7 mL Soro Controlo Negativo
- 12 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. Centrifuga 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 serem testadas. Com a Folha de Registo identificar cada amostra em dois poços (duplicado).

**PREPARAÇÃO DAS AMOSTRA E CONTROLOS**

4. Diluir da seguinte forma e misturar bem:

		SD	Volume de Amostra
PC		75 µL	75 µL
NC	1 amostra	75 µL	75 µL
	múltiplas	110 µL	110 µL
Amostra		100 µL	100 µL

5. 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.

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. **MARCAR 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 – 1 x 8	12 – 1 x 8
AG	10 µL	60 µL
SD	1.0 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.

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 – 1 x 8	12 – 1 x 8
PN	20 µL	120 µL
SB	2.0 mL	12 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 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.
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 B-SCREEN<sup>®</sup> 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
DO média	0.070 – 0.250	≥ 1.500

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 da 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 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 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.

Anticorpos linfocitotoxicos não HLA não são detectados com este ensaio.

Este produto não detecta anticorpos IgM, IgA, ou HLA classe I.

As glicoproteínas HLA classe II purificadas por afinidade usadas na produção deste produto derivam de linfocitos B transformados de EBV representando os seguintes antígenos HLA classe II: DR1, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DR103, DR51, Dr52, e DR53.

Anticorpos mono-específicos para alelos raros não representados neste pool podem não ser detectados neste ensaio.

Alguns anticorpos HLA não citotoxicos 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 II.

De forma a assegurar uma reactividade e especificidade adequadas, cada lote de B-SCREEN® é testado previamente com amostras que se sabe possuírem aloanticorpos reactivos com antígenos HLA classe II bem como amostras que não tenham tais anticorpos.

### Avaliação de Performance

#### Método Comparativo

B-SCREEN®		Método Comparativo		Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	70	3	73
	Negativo	2	132	134
	Total	72	135	207

Concordância: 97.6%

Co-positividade: 97.2%                      Co-negatividade: 97.8%

Método Comparativo: Citometria de Fluxo com Base em Esferas

### REFERÊNCIAS

1. Marsh SGE, Parham P, Barber LD, The HLA Facts Book. Academic Press 2000: 84-91.
2. Rodey Glenn E. HLA Beyond Tears. De Novo, Inc. 2000;213.



**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 BCSG

Rev. 2007-06-27 (P)

EC REP

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

[www.gtidiagnostics.com](http://www.gtidiagnostics.com)

**B-SCREEN®**

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

