

Quik-ID® Class II

UTILIZAÇÃO

Quik-ID® Class II é um imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para detectar anticorpos IgG reactivos (PRA) para antígenos HLA classe II.

Para Diagnostico *In Vitro*.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

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

O ELISA de fase sólida Quik-ID® Classe II Solid Phase fornece glicoproteínas HLA classe II obtida de linhas celulares de linfócitos B transformados de EBV, imobilizadas em diferentes micropoços através de um anticorpo monoclonal. O tipo HLA classe II de cada linha celular e o número de poços contendo cada antígeno podem ser encontrados da Folha de Registo.

O ELISA de fase sólida Quik-ID® Class II é concebido para ser usado como complemento ao B-SCREEN®. As amostras previamente identificadas como positivas no ensaio screening podem ser testads no Quik-ID® Class II para determinar um valor PRA e/ou especificidade.

PRINCÍPIO

O soro do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com glicoproteínas HLA class II 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 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: 10

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

- | | |
|------------|--|
| MS | 1. Micropoços: micropoços de base achatada nos quais foram imobilizados glicoproteínas HLA classe II. As tiras de micropoços encontram-se em sacos de alumínio reseláveis. 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 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. |
| 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-nitrofenil fosfato): Pó cristalino. Reconstituir com água desionizada ou destilada e diluir em Tampão Substrato antes de usar. Proteger da luz. |

- | |
|-----------|
| PC |
| NC |
| PS |
8. Soro Controlo Positivo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar.
 9. Soro Controlo Negativo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar.
 10. Seladores de placas.

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 subseqüentemente 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 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 deteriorização ou ciclos repetidos de congelamento/descongelamento recomenda-se que as amostras sejam alíquotadas em pequenos volumes e então congeladas.

O soro 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. 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. 5 Suportes de micropoços, cada contendo 10 – 1 x 8 tiras codificadas por cor e um cartão-chave para as cores
2. 1 x 125 mL Solução de Lavagem Concentrada
3. 1 x 50 mL Diluente de Amostra
4. 1 x 60 mL Tampão Substrato
5. 1 x 50 mL Solução de Paragem
6. 1 x 350 µL Conjugado IgG Anti-Humano
7. 5 x 50 mg Substrato PNPP
8. 1 x 0.45 mL Soro Controlo Positivo
9. 1 x 0.7 mL Soro Controlo Negativo
10. 10 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

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.**

Reagente	1 placa (2 amostras)	2 placas (4 amostras)	3 placas (6 amostras)	4 placas (8 amostras)	5 placas (10 amostras)
TCW	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL	125 mL
Água desionizada	225 mL	450 mL	675 mL	900 mL	1,125 mL

3. Determinar o número de amostras a testar.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRA E CONTROLOS

4. Diluir da seguinte forma e misturar bem:

Amostra	425 µL
SD	1.275 mL

Reagente	1 placa (2 amostras)	2 placas (4 amostras)	3 placas (6 amostras)	4 placas (8 amostras)	5 placas (10 amostras)
NC	120 µL	250 µL	350 µL	450 µL	550 µL
SD	360 µL	750 µL	1,050 µL	1.35 mL	1.65 mL
PC	60 µL	120 µL	180 µL	240 µL	300 µL
SD	180 µL	360 µL	540 µL	720 µL	900 µL

5. Cada amostra requer um conjunto de tiras codificadas por cor. Remover rapidamente e reselar as tiras não usadas no saco de protecção.

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.

Assegure-se que o bordo arredondado em cada tira está voltado para a extremidade inferior do suporte. Antes da adição de cada reagente, assegure-se que o poço A1 está no canto superior esquerdo do suporte.

NOTA: Assegurar que a ordem das tiras no suporte está de acordo com a ordem no cartão colorido.

6. Adicionar 250 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 diluída aos respectivos poços na Figura 1. Adicionar soro a todos os poços numerados e aos poços NA e MO.

	P	F	W	V	B
A	1	9	17	25	N
B	2	10	18	26	N
C	3	11	19	27	N
D	4	12	20	28	N
E	5	13	21	29	P
F	6	14	22	30	P
G	7	15	23	MO	B
H	8	16	24	NA	B

N = Controlo Neg
P = Controlo Pos
B = Branco
NA = Ausência de Antígeno
MO = Apenas Monoclonal

Letras para as cores:

P = Rosa
F = Fúscia
W = Branco
V = Violeta
B = Preto

Figura 1

NOTA: Não adicionar amostras ou reagentes aos poços branco.

NOTA: Se forem testadas múltiplas amostras em simultâneo 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.

Reagente	1 placa (2 amostras)	2 placas (4 amostras)	3 placas (6 amostras)	4 placas (8 amostras)	5 placas (10 amostras)
AG	45 µL	90 µL	135 µL	180 µL	225 µL
SD	4.5 mL	9 mL	13.5 mL	18 mL	22.5 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:

- a) Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- b) Adicionar 250 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.

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.

Reagente	1 placa (2 amostras)	2 placas (4 amostras)	3 placas (6 amostras)	4 placas (8 amostras)	5 placas (10 amostras)
PN	90 µL	180 µL	270 µL	360 µL	450 µL
SB	9 mL	18 mL	27 mL	36 mL	45 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 250 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 em 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 Quik-ID® Class II é efectuado no sistema pela inclusão dos Controlos Positivo e Negativo. Estes controlos devem ser incluídos em cada teste amostra para ajudar a determinar se ocorreram erros técnicos ou falha de reagentes.

Critérios para um teste válido:

	Controlo Negativo	Controlo Positivo
DO média	≤ 0.225	≥ 1.000

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Calcular o valo cut-off para cada poço individual da seguinte forma:

$$\text{Média dos poços de contrlo negativo (Poços A, B, C, & D da tiras pretas)} \times 2 \times \text{Background Factor de Ajustamento} = \text{Valor Cut-off para o poço (Ver Folha deRegisto)}$$

Resultados com valores de DO iguais ou maiores que o valor cut-off são considerados como resultados positivos.

Calcular a percentagem de PRA (Panel Reactive Antibody) da seguinte forma:

$$\% \text{ PRA} = \frac{\# \text{ Resultados Positivos}}{\# \text{ poços com antigénio HLA classe II}} \times 100$$

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.

O poço sem Antigénio (poço H de violeta) não contém anticorpo monoclonal ou glicoproteínas HLA e é usado para detectar ligações não específicas.

O poço “Apenas monoclonal” (poço G de tira violeta) contém apenas anticorpo monoclonal de murino. A reactividade neste poço pode ser devida a reactividade com o anticorpo de captura do sistema, presença de anticorpos para IgG de ratinho, ou devida a complexos imunes.

As amostras com valores mais elevados “Poço sem Antigénio” e/ou “Poço Apenas Monoclonal” que o valor cut-off do controlo negativo devem ser testadas por outro método.

Anticorpos linfocitotoxicos não HLA não são detectados com este ensaio.

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

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

Este produto detecta anticorpos HLA para antigénios que estão representados no painel. (Ver Folha de Registo específica de lote). Anticorpos para antigénios não representados podem não ser detectados.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

Quando armazenado adequadamente e utilizado de acordo com os procedimentos acima descritos, este produto pode detectar anticorpos para antigénios HLA classe II identificados na Ficha de Registo incluída.

Para assegurar uma reactividade e especificidade adequadas, cada lote de Quik-ID® Class II é testado previamente com amostras que se sabe possuírem aloanticorpos reactivos com antigénios HLA classe II identificados na Ficha de Registo incluída bem que não tenham tais anticorpos.

Avaliação de Performance

		Método Comparativo		
		Positivo	Negativo	Total
Quik-ID® Class II	Positivo	45	3	48
	Negativo	3	36	39
	Total	48	39	87

Concordância: 93.1%

Co-positividade: 93.7% Co-negatividade: 92.3%

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.

U.S. Patent #6,046,013



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 C2ID

Rev. 2007-08-07 (P)

EC REP

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

www.gtidiagnostics.com

Quik-ID[®] Class II

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

