

MICROAMS®

Micro-Antibody Monitoring System

UTILIZAÇÃO

O MICROAMS® é um imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para detectar anticorpos IgG para glicoproteínas HLA classe I e classe II específicas de dador.

Para Diagnostico *In Vitro*.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

O HLA é o 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 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.² As moléculas HLA classe I e classe II são glicoproteínas de membrana polimórficas. Demonstrou-se que os anticorpos para as glicoproteínas HLA são contra-indicados para um transplante bem sucedido.³⁻⁶ A monitorização pós-transplante destes anticorpos é importante na avaliação da potencial ao enxerto.^{7,8}

PRINCÍPIO

As glicoproteínas HLA são preparadas a partir de linfócitos solubilizando as células com um detergente não iónico. Uma vez solubilizados, os lisados linfocitários são adicionados a micropoços nos quais foram imobilizados anticorpos monoclonais específicos para HLA classe I ou classe II. As glicoproteínas HLA ligam-se aos anticorpos monoclonais, e as glicoproteínas não ligadas são eliminadas por lavagem. Os micropoços com as glicoproteínas ligadas são testados com soro humano para detectar anticorpos contra moléculas de HLA. Os anticorpos não ligados são eliminados por lavagem. 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.

Este kit utiliza três sistemas de controlo:

O primeiro sistema consiste em linfócitos secos (Controlo Linfocitário Seco) e um anticorpo (Soro Controlo Positivo) que se sabe ser reactivo com ambas as glicoproteínas classe I e classe II no linfócito. Os linfócitos secos são rehidratados e solubilizados para criar um lisado. O lisado é aplicado aos poços de controlo dos reagentes. O Soro Controlo Positivo é testado contra o controlo do lisado para confirmar que o tampão de lise linfocitário e os restantes reagentes estão a funcionar adequadamente.

O segundo sistema de controlo consiste em dois anticorpos monoclonais conjugados a fosfatase alcalina. Um (Reagente Controlo do Lisado Classe I) é dirigido contra as glicoproteínas HLA Classe I. O outro (Reagente Controlo do Lisado Classe II) é dirigido contra as glicoproteínas HLA Classe II. Ao serem testados directamente contra as glicoproteínas capturadas nos poços, estes reagentes vão dar resultados positivos, mostrando que as moléculas HLA Classe I e Classe II foram capturadas nos poços.

O terceiro sistema de controlo é o controlo negativo. As reacções positivas são aquelas cujos poços teste são superiores a duas vezes (2x) o valor médio dos poços controlo negativo.

REAGENTES

Número máximo de testes por kit: 44

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

- | | |
|------------|--|
| MS1 | 1. Micropoços: Tiras de micropoços de base achatada, de pequeno volume, aos quais foram imobilizadas glicoproteínas HLA classe I (cor azul) e HLA classe II (cor púrpura) purificadas por afinidade. |
| MS2 | 2. Prontos a usar. As tiras de micropoços estão fechadas num saco de alumínio reselável. |
| TCW | 3. 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 (22 - 25°C) ou até sete dias a 2 - 8°C. |

- | | |
|--------------|---|
| SD | 4. Diluente de Amostra: Solução Fosfato contendo albumina bovina. Azida sódica 0.1%. Pronto a usar. |
| SB | 5. Tampão Substrato: Esta solução contém dietanolamina e cloreto de magnésio. Azida sódica 0.02%. Pronto a usar. Proteger da luz. |
| SS | 6. Solução de Paragem: Hidróxido de sódio 3 M. Pronta a usar. Utilizar com cuidado. |
| AG | 7. Conjugado (100x): anticorpo de cabra purificado por afinidade conjugado a fosfatase alcalina para a imunoglobulina humana G (IgG). Azida sódica 0.1%. (Tampa branca.) Diluir em Diluente do Lisado e Conjugado antes de usar. |
| LCD | 8. Diluente do Lisado e Conjugado: Solução Tris tamponada contendo cloreto de sódio, azida sódica. 0.05%. (tampa azul.) Pronta a usar. |
| LLB | 9. Tampão de Lise Linfocitária (10x): Solução salina Tris tamponada contendo um detergente não iónico e azida sódica 0.5%. Diluir em água desionizada ou destilada antes de usar. |
| LCRI | 10. Reagente Controlo do Lisado Classe I (LCRI) (100x): Imunoglobulina G (IgG) anti-humana de ratinho conjugada a Fosfatase Alcalina específica para glicoproteínas HLA classe I e azida sódica 0.1%. (Tampa azul) Diluir em Diluente do Lisado e do Conjugado antes de usar. |
| LCRII | 11. Reagente Controlo do Lisado Classe II (LCRII) (100x): Imunoglobulina G (IgG) anti-humana de ratinho conjugada a Fosfatase Alcalina específica para glicoproteínas HLA classe II e azida sódica 0.1%. (Tampa púrpura) Diluir em Diluente do Lisado e do Conjugado antes de usar. |
| DLC | 12. Botão de Controlo Linfocitário Seco: Linfócitos secos. Preparar como aconselhado. |
| PN | 13. 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 | 14. Soro Controlo Positivo (4x): Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |
| NC | 15. Soro Controlo Negativo (4x): Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar. |
| PS | 16. Seladores de placas. |

PRECAUCÕES

- Não usar reagentes turvos ou contaminados.
- Não utilizar os reagentes para além da sua data de validade.
- A substituição dos componentes por outros que não sejam fornecidos no kit pode conduzir a resultados inconsistentes ou errados.
- Os micropoços e reagentes contidos no kit não devem ser usados com qualquer outro tipo de teste.
- Ao fazer as diluições, seguir as instruções do produtor das pipetas para uma dispensação e técnica de lavagem apropriadas.
- Para a adição dos reagentes devem ser usadas pipetas rigorosamente calibradas.
- A aglomeração dos linfócitos antes da lise pode causar preparações de lisados deficientes e resultar em valores baixos quando testados com os Reagentes Controlo dos Lisados. É importante tratar as células com cuidado para evitar a sua aglomeração. A contaminação de uma preparação de linfócitos com glóbulos vermelhos pode baixar a quantidade de glicoproteínas HLA no lisado se não forem removidos antes a estimativa do volume de células concentradas.
- Velocidades de centrifugação superiores às recomendadas podem causar lise prematura dos linfócitos, aglomeração, e perda de linfócitos.
- Os lisados podem ser armazenados congelados a -70 a -80°C antes de usar. Os lisados não devem ser novamente congelados.
- Tem de se ter cuidado para evitar a contaminação do Diluente do Lisado e Conjugado, LCRI, LCRII, e do Conjugado. A contaminação inadvertida destes reagentes com soro humano resulta na neutralização do LCRI, LCRII, e Conjugado e conseqüente invalidação do teste.
- Deitar fora quaisquer porções não usadas de Conjugado diluído, Tampão de Lise Linfocitária diluído, Reagentes Controlo do Lisado diluídos, Controlos Positivo e Negativo diluídos e PNPP reconstituído e diluído após cada ensaio.

- 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.
- Devido à pequena dimensão dos micropoços de pequeno volume, é essencial que o leitor de placas seja verificado para um alinhamento adequado.
- Não utilizar um comprimento de onda de referência ao ler a placa no leitor.

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 contém 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

Células: O baço deve ser colhido de acordo com os procedimentos locais e processado nas 72 horas após colheita. Os linfócitos de sangue periférico devem ser colhidos em tubos com heparina de sódio ou ACD com técnica asséptica, armazenados à temperatura ambiente, e devem ser processados nas 72 horas após colheita.

Soro: O sangue deve ser colhido 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 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 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, que não contém anticorpos para glicoproteínas HLA, 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. 12 – 1 x 8 tiras de micropoços de pequeno volume com suporte contendo anticorpo monoclonal imobilizado para glicoproteínas HLA classe I com marca azul.
2. 12 – 1 x 8 tiras de micropoços de pequeno volume com suporte contendo anticorpo monoclonal imobilizado para glicoproteínas HLA classe II com marca púrpura.
3. 1 x 125 mL Solução de Lavagem Concentrada
4. 1 x 14 mL Diluente de Amostra
5. 1 x 14 mL Tampão Substrato
6. 1 x 14 mL Solução de Paragem

7. 1 x 120 µL Conjugado IgG anti-humano
8. 1 x 14 mL de Diluente do Lisado e Conjugado
9. 1 x 2.5 mL de Tampão de Lise Linfocitária
10. 1 x 14 µL Reagente Controlo do Lisado Classe I
11. 1 x 14 µL Reagente Controlo do Lisado Classe II
12. 1 x botão, Botão de Controlo Linfocitário Seco
13. 6 x 50 mg Substrato PNPP
14. 1 x 200 µL Soro Controlo Positivo
15. 1 x 200 µL Soro Controlo Negativo
16. 18 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 1 – 10 µL , 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
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
11. Meio de cultura celular
12. Gradiente de densidade para separação dos linfócitos (1.077 g/mL)
13. Gelo

Este procedimento está dividido em três partes principais: “Preparação do Lisado do Controlo Linfocitário Seco”, “Preparação do Lisado do Dador”, e “Procedimento teste”. Dados importantes:

1. O lisado do dador e do controlo pode ser preparado antes de tempo e as aliquotas congeladas a -70 a -80°C. Se o lisado do dador e do controlo tiverem sido previamente preparados, seguir o “Procedimento teste”.
2. Tem de se incluir um Controlo Negativo e um Controlo de Lisado para cada lisado de dador testado.
3. O Reagente Controlo (Soro Controlo Positivo) tem de ser incluído em cada ensaio classe I e classe II.
4. Para reduzir o efeito das proteases sobre as glicoproteínas HLA, os lisados linfocitários podem ser mantidos em gelo por um curto período de tempo que não exceda as 4 horas.
5. Congelar prontamente qualquer lisado não diluído de dador ou de controlo em pequenas aliquotas (utilização única) em tubos selados e identificados a -70 a -80°C até dois anos.
6. É crítico centrifugar às rcf recomendadas. NÃO variar as velocidades de centrifugação estabelecidas.

Preparação do Lisado do Controlo Linfocitário Seco:

1. Rehidratar o Controlo Linfocitário Seco
 - a) Rehidratar o botão de Controlo Linfocitário Seco (**DLC**) adicionando 500 µL de meio de cultura celular ao botão de células seco.
 - b) Deixar à temperatura ambiente por pelo menos 1 hora.
 - c) Retirar o botão de células com o auxílio de uma ponta de pipeta e vortex para obter uma suspensão celular.
 - d) Centrifugar a mistura a 1,000 - 1,500 rcf durante 5 minutos para formar um botão de células.
 - e) Manter o sobrenadante sobre as células até estas serem lisadas.
2. Lise do Controlo Linfocitário Seco
 - a) Preparar 0.5 mL de tampão de lise diluído adicionando 50 µL de Tampão de Lise a 450 µL de água destilada ou desionizada. Armazenar o tampão de lise diluído em gelo até 4 horas.

NOTA: O Tampão de Lise Linfocitária é viscoso. Premir a ponta da pipeta 2.3 vezes no tampão antes de dispensar e enxaguar após adição a água destilada ou desionizada. Misturar bem.

- b) Remover o sobrenadante do Controlo Linfocitário seco reidratado (**DLC**).

- c) O Controlo Linfocitário Seco rehidratado (**DLC**) deve ser lisados em 500 μL Tampão de Lise Linfocitária *diluído*. Misturar bem com o auxílio de uma ponta de pipeta e vortex para resuspending completamente as células. Centrifugar a mistura a 1,000 - 1,500 rcf durante 3 – 5 minutos para sedimentar as membranas celulares. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e identificado.
- d) O Lisado do Controlo Linfocitário Seco deve ser mantido em gelo até ser usado no ensaio (não exceder as 4 horas). O Lisado do controlo Linfocitário seco pode ser armazenado congelado a -70 a -80°C para utilização futura.

Preparação do Lisado do Dador:

1. Calcular a quantidade de células a preparar

- a) Designar o local para cada amostra de soro a ser testada utilizando as Folhas de Registo incluídas.
- b) Completar o primeiro cálculo na Folha de Cálculo para o Lisado para determinar a quantidade necessária de lisado *diluído*.
- c) Completar o segundo cálculo para determinar o volume necessário de lisado *não diluído* para as tiras da classe I.
- d) Completar o terceiro cálculo para determinar o volume necessário de lisado *não diluído* para as tiras da classe II.
- e) Para o quarto cálculo, adicionar o volume do lisado da classe I ao volume de lisado da classe II para obter o volume total necessário de lisado não diluído.
- f) Usar o último cálculo para determinar o volume de células a preparar.
- g) Documentar todas as diluições e cálculos na Folha de Registo.

2. Isolar as Células do Dador

Os Linfócitos podem ser obtidos quer de sangue total quer do baço. O sangue total ou baço devem ser processados até 72 horas após colheita.

Sangue Total:

- a) Usando sangue total, colocar um meio de separação linfocitária (1.077 g/mL) e centrifugar a 1,000 - 1,500 rcf durante 15 a 20 minutos. Recolher a camada de células na interface do meio de separação. Deve-se ter cuidado para minimizar o número de glóbulos vermelhos na preparação.
- b) Transferir a suspensão para um tubo maior e centrifugar a 1,000 - 1,500 rcf durante 5 a 10 minutos para sedimentar as células. Remover o sobrenadante.
- c) Adicionar um volume de meio de cultura celular igual a pelo menos 5 vezes o volume do botão. Resuspending as células com cuidado.
- d) Centrifugar o botão de células e remover o sobrenadante (primeira lavagem).
- e) Repetir c) e d) para um total de 3 lavagens.
- f) Após a lavagem final manter o sobrenadante sobre as células até estas serem lisadas.

Baço:

- a) Para preparar linfócitos a partir do baço, macerar para quebrar o tecido em pequenas partículas, suspender em meio de cultura celular completo, colocar em gradiente de densidade (1.077 g/mL) e centrifugar a 1,000 - 1,500 rcf durante 15 a 20 minutos. Recolher a camada de células na interface do gradiente.
- b) Transferir a suspensão para um tubo maior e centrifugar a 1,000 - 1,500 rcf durante 5 a 10 minutos para sedimentar as células. Remover o sobrenadante.
- c) Adicionar um volume de meio de cultura celular iguala pelo menos 5 vezes o volume do botão. Resuspending as células com cuidado
- d) Centrifugar o botão de células e remover o sobrenadante (primeira lavagem).
- e) Repetir c) e d) para um total de 3 lavagens.
- f) Após a lavagem final manter o sobrenadante sobre as células até estas serem lisadas.

3. Lise das Células do Dador

- a) Por cada 100 μL de linfócitos concentrados a serem lisados preparar 1.0 mL de tampão de Lise diluído adicionando 100 μL de Tampão de Lise a 900 μL de água destilada ou desionizada. Armazenar o tampão de lise diluído em gelo até 4 horas.

NOTA: O Tampão de Lise Linfocitária é viscoso. Premir a ponta da pipeta 2-3 vezes no tampão antes de dispensar e enxaguar após adição a água destilada ou desionizada. Misturar bem.

- b) Transferir o volume necessário de células de dador para um tubo teste por um dos dois seguintes métodos:
- i)
 - Remover o sobrenadante do botão de células lavadas.
 - O volume de células concentradas pode ser verificado adicionando um volume igual de água a um tubo teste idêntico e medindo o volume de água.
 - Adicionar um volume igual de meio de cultura celular ao botão de células para fazer 50% de suspensão celular.
 - Misturar bem e transferir duas vezes o volume necessário de células concentradas (calculado no passo 1 acima) para um tubo teste.
 - Centrifugar a suspensão celular a 1,000 - 1,500 rcf durante 5 a 10 minutos para obter um botão com o volume desejado de linfócitos.
 - Remover o sobrenadante.
- c) Por cada 10 µL de células de dador concentradas ($\approx 30 \times 10^6$ células) adicionar 100 µL de Tampão de Lise Linfocitária *diluído*. Misturar bem com o auxílio de uma ponta de pipeta e vortex para resuspender completamente as células. Centrifugar a mistura a 1,000 - 1,500 rcf durante 3 – 5 minutos para sedimentar as membranas celulares. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e identificado.
- ii) Em alternativa, contar os linfócitos e transferir (usando a próxima tabela como guia) o número apropriado de células para um tubo teste de polipropileno. Centrifugar a 1,000 - 1,500 rcf durante 5 minutos para obter um botão de linfócitos. Remover o sobrenadante.

Volume de Linfócitos Concentrados	# estimada de Linfócitos obtidos de Sangue Periférico	# estimada de Linfócitos obtidos de Células do Baço
10 µL	30×10^6 células	30×10^6 células
20 µL	50×10^6 células	60×10^6 células

Se se estiver a utilizar lisado congelado, descongelar uma alíquota imediatamente antes de usar e diluir apropriadamente como descrito no passo 4 do Procedimento Teste (ver em baixo).

Para as tiras da Classe I, são necessários 2 µL de lisado não diluído ou 6×10^5 de células lisadas por poço.

Para as tiras da Classe II, são necessários 4 µL de lisado não diluído ou 12×10^5 de células lisadas por poço.

Procedimento Teste

1. Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente (22 - 25°C).
2. Preparar a Solução de Lavagem de trabalho diluindo a Solução de Lavagem Concentrada (TCW). 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.
4. Diluir uma quantidade apropriada de lisado de dador ou de Controlo Linfocitário Seco em Diluente do Lisado e Conjugado (LCD) de acordo com os cálculos da Folha de trabalho da seguinte forma:
 - a) Marcar um tubo “Lisado Dador Classe I”. Preparar a quantidade apropriada de lisado para as tiras da classe I diluindo 1 parte de lisado com 7 partes de Diluente do Lisado e Conjugado (LCD).
 - b) Marcar um segundo tubo “Lisado Dador Classe II”. Preparar a quantidade apropriada de lisado para as tiras da classe II diluindo 1 parte de lisado com 3 partes de Diluente do Lisado e Conjugado (LCD).
 - c) Marcar um terceiro tubo “Controlo Linfocitário Seco”. Preparar a quantidade apropriada de lisado de controlo linfocitário seco diluindo 1 parte de lisado de controlo linfocitário seco com 3 partes de Diluente do Lisado e Conjugado (LCD). Notar que a diluição para o controlo linfocitário seco é a mesma para ambas as tiras classe I e classe II e que este controlo deve ser usado nos poços de controlo de reagente e ambos os tipos de tiras.
5. Remover os suportes de micropoços (MS1 e MS2) do saco. Remover o número necessário de tiras MS1 e MS2. Reselar as tiras que não forem necessárias no saco de protecção.

NOTA: O kit fornece apenas dois suportes. 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 15 µL de lisado de Controlo Linfocitário Seco *diluído* aos poços das tiras de ambas as classes I e II designadas como Controlo de Reagente.
7. Adicionar 15 µL de lisado de dador classe I e classe II *diluído* a todos os poços designados para amostra, Controlo Negativo e Controlo de Lisado em cada tira classe I (azul) e classe II (púrpura).

NOTA: Se forem testadas múltiplas amostras em simultâneo MARCAR CADA TIRA PARA EVITAR ERROS

NOTA: Não adicionar amostras de lisado ou reagentes aos poços Branco.

Assegurar a adição de lisado diluído classe I às tiras azuis e de lisados diluído classe II às tiras púrpura. A adição da diluição errada pode resultar na não validação do ensaio.

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

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E CONTROLOS

9. Diluir o Soro Controlo Positivo (**PC**), Soro Controlo Negativo (**NC**), e soro dos pacientes em Diluente de Amostra (**SD**) como se mostra a seguir e misturar bem.

	Volume de Diluente de Amostra (SD)	Volume de Amostra
PC	60 µL	20 µL
NC (por lisado de dador)	60 µL	20 µL
Amostra (por lisado de dador)	60 µL	20 µL

NOTA: Desta forma ter-se-á amostra suficiente para testar dois poços classe I e dois poços classe II. Centrifugar o soro do paciente a velocidade elevada numa microcentrifuga durante 5-10 min. Remover o sobrenadante para utilização.

10. LAVAGEM:

- a) Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- b) Adicionar 140 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
- c) Aspirar ou decantar.
- d) Repetir os passos b + c para um total de 3 lavagens.
- e) Decantar vigorosamente para remover qualquer Solução de Lavagem residual. Inverter em papel absorvente para evitar a secagem.

11. Usando a Folha de Registo como guia, adicionar as amostras diluídas e reagentes controlo aos respectivos poços da seguinte forma:

- a) Adicionar 15 µL de Soro Controlo Positivo diluído aos poços Controlo de Reagente de ambas as tiras contendo lisado de Controlo Linfocitário seco.
- b) Adicionar 15 µL de Soro Controlo Negativo diluído aos poços Controlo Negativo.
- c) Adicionar 15 µL de Diluente do Lisado e Conjugado aos poços Controlo de Lisado das tiras classe I e classe II. Desta forma, evita-se que os poços sequem durante a incubação seguinte.
- d) Adicionar 15 µL de soro de pacientes diluído aos respectivos poços contendo lisado de dador.

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

NOTA: Durante o período de incubação efectuar os dois passos seguintes:

13. Diluir o Conjugado (**AG**) 1:100 em Diluente do Lisado e Conjugado (**LCD**). Utilizar um recipiente de polipropileno.

Tiras:	4 - 1x8	24 - 1x8
AG	7 µL	50 µL
LCD	700 µL	5 mL

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

14. Diluir os Reagentes Controlo do Lisado (**LCRI** e **LCRII**) em Diluente do Lisado e Conjugado (**LCD**) da seguinte forma:

LCRI ou LCRII	2 μ L
LCD	198 μ L

Misturar bem.

NOTA: A medição rigorosa dos reagentes LCR é importante para a obtenção de valores aceitáveis de Controlo do Lisado.

15. LAVAGEM:

- Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- Adicionar 140 μ L de Solução de Lavagem de trabalho.
- Aspirar ou decantar.
- Repetir os passos b + c para um total de 3 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.

16. Adicionar 15 μ L de Controlo do Lisado por poço aos poços do Reagentes Controlo do Lisado apropriados:

- Adicionar LCRI diluído às tiras classe I (azuis)
- Adicionar LCRII diluído às tiras classe II (púrpura)

17. Adicionar 15 μ L de Conjugado *diluído* por poço (preparado num dos passos prévios) a todos os poços restantes excepto os poços Controlo do Lisado e Branco.

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

NOTA: Durante o período de incubação efectuar os dois passos seguintes:

19. 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.

20. Diluir o PNPP (**PN**) com o Tampão Substrato (**SB**) da seguinte forma:

Tiras:	4 - 1x8	24 - 1x8
PN	20 μ L	120 μ L
SB	2 mL	12 mL

Misturar bem. Proteger da luz até ser utilizado. Pode ser armazenado até 45 minutos à temperatura ambiente (22 a 25°C) antes de ser utilizado.

21. LAVAGEM:

- Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e blot em papel absorvente.
- Adicionar 140 μ L de Solução de Lavagem de trabalho.
- Aspirar ou decantar.
- Repetir os passos b + c para um total de 3 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.

22. Adicionar 50 μ L da solução PNPP diluída a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.

23. 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.

24. Parar a reacção adicionando 50 µL de Solução de Paragem a cada poço na mesma sequência que foi adicionado o substrato. Adicionar 100 µL de Solução de Paragem aos poços branco.
25. Ler a absorvância (DO) de cada poço 405 ou 410 nm. Se os resultados não puderem ser lidos imediatamente, colocar os poços no escuro até 30 minutos.

NOTA: Não usar um comprimento de onda de referência ao ler a placa.

26. 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.
27. Registrar os resultados na Folha de Registo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade MICROAMS® é efectuado no sistema incluindo pela inclusão dos Controlos Positivo e Negativo e Reagentes Controlo do Lisado. 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 Médio (NC)	Controlo Positivo Médio (PC)
DO média	≤ 0.300	≥ 1.000

Os poços Reagente Controlo do Lisado têm de mostrar uma reactividade positiva (>2x o valor obtido para a média do controlo negativo). Uma reacção positiva nos poços Controlo do Lisado indica que foram capturadas glicoproteínas HLA nesses poços. Este controlo não identifica necessariamente um lisado não preparado ou não diluído correctamente, nem assegura a reactividade serológica adequada da glicoproteína.

Num estudo com 35 lisados de baços diferentes os resultados típicos para o Controlo do Lisado classe I tiveram uma gama DO de 1.255 – 3.049 com um valor médio de DO de 2.124 e para o Controlo do Lisado classe II tiveram uma gama de DO de 0.766 – 2.366 com um valor médio de DO de 1.808.

Os valores de DO para amostras positivas obtidos de testes em duplicado devem estar entre 20% da média dos duplicados. As amostras cujos resultados não se encontrem dentro deste limite devem ser retestadas.

NOTA: Maus duplicados podem ser resultado de omissão de reagente ou amostra, adição e mistura irregular de reagentes, técnicas de lavagem deficientes, temperaturas de incubação irregulares, deficiência do leitor de placas, ou desvio de luz na incubação final, ou contaminação entre poços. O não testar em duplicado pode significar aceitar resultados errados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados com valores de DO iguais ou superiores a 2X o valor obtido da média 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, lisado insuficiente 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 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 ensaio apenas detecta anticorpos IgG.

As características de performance deste produto foram estabelecidas usando soros com anticorpos com reactividade conhecida contra os loci HLA A, B, e DR.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

Para assegurar uma reactividade e especificidade adequadas, cada lote de MICROAMS[®] é testado, antes de ser colocado no mercado, com amostras que contêm anticorpos HLA específicos de dador.

Avaliação de Performance

O MICROAMS[®] foi testado contra o kit Antibody Monitoring System (AMS[®]) da GTI num estudo comparativo. Foram avaliadas um total de 100 amostras no MICROAMS[®] e AMS[®] para a reactividade HLA classe I. Foram avaliadas um total de 100 amostras no MICROAMS[®] e AMS[®] para a reactividade HLA classe II.

		AMS [®] Class I		Total
		Positivo	Negativo	
MICROAMS [®] Class I	Positivo	52	0	52
	Negativo	0	49	49
	Total	52	49	101

Concordância: 100%

Método Comparativo: GTI Antibody Monitoring System: HLA Class I and Class II (AMS[®]1+2)

Classe I	Co-positividade/ Sensibilidade	Co-negatividade/ Especificidade
Valor	100%	100%
95% nível de confiança (inferior)	93.1%	92.7%
95% nível de confiança (superior)	100%	100%

		AMS [®] Class II		Total
		Positivo	Negativo	
MICROAMS [®] Class II	Positivo	49	0	49
	Negativo	0	52	52
	Total	49	52	101

Concordância: 100%

Método Comparativo: GTI Antibody Monitoring System: HLA Class I and Class II (AMS[®]1+2)

Classe II	Co-positividade/ Sensibilidade	Co-negatividade/ Especificidade
Valor	100%	100%
95% nível de confiança (inferior)	92.7%	93.1%
95% nível de confiança (superior)	100%	100%

Precisão

Para avaliar a precisão do MICROAMS[®], foram conduzidos estudos inter-ensaio e intra-ensaio. A avaliação de todos os dados foi feita de acordo com o protocolo NCCLS para Avaliação da Performance de Testes Qualitativos: Guideline Aprovada EP12-A. Os dados demonstraram uma concordância de 100% no mesmo ensaio (n=20), uma concordância de 100% entre ensaios (n=40), e uma concordância de 100% de lote para lote (3 lotes, n=24) nos resultados reportáveis obtidos.

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.
3. Iwaki Y, Terasaki PI, Iwatsuki S, Starzi T, Berne T, Karp R, Heintz F, Hermes M, Ardman L, Wong H, Volpicelli M. Posttransplant serum analysis in human kidney allografts. Transplant Proc 1981 Mar;13 (1 Pt 1):178-180.
4. Karuppan SS, Ohlman S, Moller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. Transplantation 1992; 54:839.

5. Ettenger RB, Terasaki PI, Ting A, Melezkadeh MH, Pennisi AJ, Ulttenbogaart CH, Fine RN. Role of antibodies to B lymphocytes in renal transplantation. *Transplant Proc* 1977 Mar;9 (1): 751-753.
6. Scronik JC, LeFor WM, Ciccirelli JC, Brunson ME, Bogaard T, Howard RJ, Ackerman JR, Mendez R, Shires DL Jr, Pfaff WW. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B células. *Transplantation* 1992; S4 (1):61-64.
7. Zachary A, Ratner L, and Leffell M, Low Levels of HLA-specific Antibody: Relevance, Detection, and Treatment. *Transplantation Proceedings* 2001; 33:469-470.
8. Moore SB, Pleger N, and DeGoey S, Comparison of a Solid Phase Enzyme Linked Immunoassay with Anti-Globulin-Augmented Lymphocytotoxicity. *Transplantation* 1997; 64 (11):1617-1620.



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 M-AMS

Rev. 2007-10-22 (P)

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

www.gtidiagnostics.com

MICROAMS®

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

