

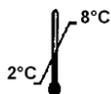


Pak Lx™ Assay (ensaio)

REF

PLX

IVD



Atenção! Consultar documentos em anexo.

Software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT! v1.0.1 (REF 888622)

Manual do utilizador do software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT! (REF LC1371)

Guia de consulta rápida do software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT! (REF LC1374)



Sensível à luz
(Conservar ao abrigo da luz)

ÍNDICE

APLICAÇÃO	2
RESUMO E EXPLICAÇÃO	2
PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO	2
REAGENTES	2
PRECAUÇÕES	3
ATENÇÃO	3
INSTRUMENTAÇÃO	3
COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS	3
PROCEDIMENTO	4
CONTROLO DE QUALIDADE	7
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	7
LIMITAÇÕES	8
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	8
CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO	9
BIBLIOGRAFIA	11

Licença de rótulo de utilização restrita:

Ao abrir a embalagem que contém este kit (que possui microesferas com marcador fluorescente autorizadas pela Luminex Corporation) ou utilizar este kit de qualquer forma, está a dar o seu consentimento e a sua concordância para cumprimento dos seguintes termos e condições. Também concorda que os seguintes termos e condições constituem um contrato vinculativo e legalmente válido que pode ser executado contra si. Se não concordar com todos os termos e condições a seguir descritos, deverá devolver de imediato este kit para que lhe seja reembolsado o valor despendido antes de o utilizar de alguma forma.

Você, o cliente, adquire o direito, ao abrigo dos direitos de patentes da Luminex Corporation, caso existam, de utilizar este kit ou qualquer parte deste kit, incluindo, sem limitações, as microesferas nele contidas, apenas com a instrumentação de teste analítico fluorescente com laser da Luminex Corporation comercializado sob a denominação instrumento Luminex.

APLICAÇÃO

O ensaio Pak Lx é um imunoenensaio qualitativo para utilização no instrumento Luminex. O ensaio Pak Lx foi concebido para detetar e diferenciar anticorpos IgG contra HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, GPIV e HLA Classe I em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

As plaquetas expressam diversas proteínas polimórficas. Alterações nas proteínas, embora não afetem a função proteica, tornam-se alvos para anticorpos em resultado de gravidez ou transfusão. A presença de anticorpos que se ligam às glicoproteínas plaquetárias está associada a distúrbios sanguíneos potencialmente fatais, tais como a refratariedade a transfusões plaquetárias (Platelet Transfusions - PT), púrpura pós-transfusão (Post.Transfusion Purpura - PTP) e trombocitopenia aloimmune fetal e neonatal (Fetal and Neonatal Alloimmune - FNAITP).¹⁻¹³

Nas glicoproteínas-alvo (GP) dos anticorpos incluem-se a GPIIb/IIIa, a GPIb/IX e a GPIa/IIa, a glicoproteína GPIV e os antígenos leucocitários humanos (Human Leukocyte Antigens — HLA) de Classe I. Os epítomos que se encontram nas glicoproteínas GPIIb/IIIa, GPIb/IX e GPIa/IIa foram caracterizados em sistemas de antígenos de plaquetas humanas (Human Platelet Antigen — HPA) de dois alelos cada (alelos “a” e “b”). Os HPA-1, HPA-3 e HPA-4 estão todos localizados na GPIIb/IIIa. O HPA-2 está localizado na GPIb/IX e o HPA-5 na GPIa/IIa.¹⁴⁻¹⁶ Os epítomos da GPIV são apresentados apenas como isoantígenos. Por outras palavras, o desenvolvimento de anticorpos anti-GPIV ocorre em indivíduos sem expressão da GPIV ou com níveis de expressão significativamente reduzidos, mas que foram expostos à GPIV.¹⁷ O HLA Classe I é codificado por vários alelos que expressam um grande número de diversos epítomos. A grande maioria dos anticorpos produzida em resposta a gravidez ou a transfusão será reativa com o HLA Classe I altamente polimórfico.¹⁸

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

As esferas Pak Lx são reconstituídas e incubadas com uma amostra de soro à temperatura ambiente. As esferas são depois lavadas para remoção dos anticorpos não ligados. Em seguida, é adicionado um anticorpo IgG anti-humano conjugado com a ficoeritrina (Phycoerythrin PE). Após nova incubação à temperatura ambiente, a mistura de reação é diluída e analisada no instrumento Luminex. A intensidade do sinal de cada esfera é comparada com a intensidade do sinal de três esferas de controlo negativo incluídas na preparação das esferas, para determinar se a esfera é positiva ou negativa para o anticorpo ligado.

REAGENTES

Número máximo de testes por kit:

- **PLX: 16 testes por kit**

Todos os reagentes devem ser conservados tal como indicado no rótulo.

	REF	
PLXB	403620	Mistura de microesferas liofilizada: uma mistura de esferas nas quais foram imobilizadas glicoproteínas HPA, GPIV e HLA, bem como quatro esferas de controlo. As microesferas estão liofilizadas num tampão à base de fosfato contendo albumina sérica bovina e metietilsotiazolona a 0,02% e bromonitrodioxano a 0,02% como conservantes. SENSÍVEL À LUZ. Manter a exposição de rotina à luz por um período inferior ou igual a três horas. Conservar entre 2 °C e 8 °C em local escuro na caixa de kit.
PLBD	405160	Diluyente de Microesferas: um tampão à base de fosfato contendo NaCl, Tween-20, ProClin 300, albumina sérica bovina e soro murino. Conservar entre 2 °C e 8 °C.
CCX	405159	Conjugado concentrado: IgG caprina anti-humana conjugada com ficoeritrina, fornecida num tampão de conservação à base de fosfato contendo NaCl, Tween-20, < 0,1% de azida de sódio e albumina sérica bovina. SENSÍVEL À LUZ. Evitar a exposição à luz direta por períodos de tempo prolongados (2 horas ou menos). Conservar entre 2 °C e 8 °C em local escuro. Diluir 1:10 em Diluyente Conjugado antes do uso.
CDX	403586	Conjugado diluyente: um tampão à base de fosfato contendo NaCl, Tween-20, azida de sódio a 0,1%, albumina sérica bovina e soro murino. Conservar entre 2 °C e 8 °C.
LMWB	405314	Solução Tampão: um tampão à base de fosfato contendo NaCl, Tween-20, azida de sódio a 0,1% e albumina sérica bovina. Conservar entre 2 °C e 8 °C.

PCX	403595	Soro controlo positivo: este soro ou mistura sérica é obtido de um ou mais indivíduos com anticorpos conhecidos para HPA-1-A, com ou sem anticorpos contra HLA de classe I. Conservar entre 2 °C e 8 °C. Contém azida de sódio a 0,1%.
NCX	403592	Soro controlo negativo: este soro ou mistura sérica é obtido de indivíduos(s) que não têm anticorpos conhecidos contra HPA, GPIV e HLA Classe I. Conservar entre 2 °C e 8 °C. Contém azida de sódio a 0,1%.

PRECAUÇÕES

- Para utilização no diagnóstico in vitro.
- Não utilizar reagentes com turvação ou contaminação.
- Não utilizar reagentes além do respetivo prazo de validade.
- Eliminar todos os controlos positivos, controlos negativos e conjugado não usados/diluídos após a utilização.
- Os reagentes contidos no kit não se destinam a ser utilizados em conjunto com qualquer outro sistema de teste.
- A substituição de componentes por outros além dos fornecidos neste kit pode conduzir a resultados inconsistentes ou erróneos.
- Seguir as instruções do fabricante de pipetas relativas às técnicas adequadas de distribuição e enxaguamento ao efetuar as diluições.
- DEVE ter-se cuidado para evitar a contaminação do Conjugado diluente ou do reagente de IgG anti-humano. A contaminação accidental destes reagentes com soro humano originará a neutralização da IgG anti-humana e resultará subsequentemente em falha do teste.
- Deve ter-se cuidado ao pipetar para a placa com filtro, certificando-se de que as esferas não aderem à parte lateral dos poços da microplaca para os quais se está a pipetar, tendo ainda cuidado para não tocar na membrana com a ponta. O contacto da membrana com a ponta da pipeta pode levar à perfuração da membrana e posterior falha do ensaio.
- Deve ter-se cuidado para garantir, durante os passos da incubação, que as esferas não estão a salpicar e a aderir às partes laterais dos poços. Os controlos positivo e negativo têm de ser incluídos em cada teste para ajudar a determinar a ocorrência de erros técnicos ou falhas de reagentes.
- Deve ter-se cuidado para controlar a intensidade da aspiração. Uma pressão de aspiração forte poderá fazer com que as esferas adiram à membrana, o que origina uma falha na sua contagem.

ATENÇÃO

- Todo o soro humano utilizado nos controlos positivo e negativo deste produto foi testado, por métodos aprovados pela FDA, tendo-se obtido resultados negativos para anticorpos contra o VIH, VHC e AgHBs. Nenhum método de teste pode, contudo oferecer a total garantia de ausência de VIH, vírus da hepatite C, vírus da hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Por conseguinte, estes materiais devem ser manuseados como se fossem potencialmente infecciosos.
- Alguns reagentes contêm azida de sódio como conservante, um composto que poderá reagir com a canalização de chumbo e de cobre e formar azidas metálicas explosivas. Utilizar grandes quantidades de água quando eliminar estes materiais pelo cano.
- Eliminar todos os materiais após a utilização de acordo com os regulamentos locais.

INSTRUMENTAÇÃO

O instrumento Luminex onde é executado o software Luminex IS 2.3 ou xPONENT 3.1 destina-se a ser utilizado na realização do ensaio Pak Lx. O sistema de instrumento Luminex baseia-se nos princípios da citometria de fluxo e inclui o analisador Luminex, a plataforma de manuseamento de placas Luminex XY™ e o sistema de distribuição do fluido envolvente ("sheath fluid"), o software e o PC Luminex SD™. O sistema Luminex resulta da combinação de três tecnologias xMAP principais. A primeira são as microesferas, uma família de 100 microesferas de poliestireno de 5,6 µm com corante fluorescente que atuam como o identificador e a superfície sólida onde decorre o ensaio. A segunda é um instrumento à base de citometria de fluxo, o analisador Luminex, que integra importantes componentes da deteção, tais como lasers, componentes óticos, fluidos e processadores de sinais digitais de alta velocidade. O terceiro componente é o software, concebido para a aquisição de dados baseada em protocolos.

As informações específicas sobre as características do software, instalação do equipamento, funcionamento, a manutenção e a segurança do instrumento são fornecidas no Luminex IS Training Manual (Manual de formação Luminex IS). O utilizador deve contactar a Luminex Corporation para serviços específicos relativos ao sistema de instrumento Luminex.

Os ficheiros do ensaio necessários para utilizar com o ensaio Pak Lx são fornecidos pela Immucor GTI Diagnostics no seu website para serem transferidos pelo utilizador. O utilizador deve contactar a Immucor GTI Diagnostics em relação a quaisquer dúvidas relativas a produtos necessários para o ensaio Pak Lx.

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Proceder à colheita de sangue sem anticoagulante, utilizando uma técnica asséptica. Processar o sangue enquanto ainda está fresco para minimizar a probabilidade de obter reações falso-positivas ou falso-negativas devido a conservação inadequada ou a contaminação da amostra.

Apenas o soro é adequado para este ensaio.

O soro deve ser separado dos glóbulos vermelhos quando conservado ou transportado.

As amostras que contenham partículas deverão ser clarificadas por centrifugação antes da realização do teste.

As amostras de soro que não possam ser testadas de imediato devem ser conservada entre 2 °C e 8 °C, durante um período não superior a 48 horas, ou congeladas. As amostras congeladas a uma temperatura inferior ou igual a -20 °C mantêm-se em bom estado até 2 anos. Evitar congeladores sem gelo ("frost-free"). Evitar a congelação e descongelação repetidas das amostras de soro.

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos:

(Consulte a secção REAGENTES para obter informações mais específicas.)

Os frascos podem conter mais reagente do que o indicado nos rótulos. Ao fazer diluições, não se esqueça de medir o reagente com um dispositivo adequado.

1. 3 x Microesferas liofilizada
2. 1 x 850 µl de diluente de Microesferas
3. 1 x 120 µl de Conjugado concentrado
4. 1 x 1,2 ml de Conjugado diluente
5. 1 x 50 ml de Solução Tampão
6. 1 x 80 µl de soro controlo positivo
7. 1 x 80 µl de soro controlo negativo

Materiais adicionais necessários:

(conforme listados ou equivalentes)

1. Pipetas reguláveis de 5 µl a 50 µl com pontas de pipeta adequadas
2. Pipeta multicanal de 250 µl com pontas correspondentes e canal para tampão
3. Tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml para diluições do conjugado
4. Tubos de ensaio
5. Temporizador
6. Marcador
7. Selantes de placa
8. Fluido envolvente Luminex
REF 628005 (1X); REF 628025 (20X)
9. Esferas de calibração e de controlo Luminex
REF 628006 (CAL1); REF 628007 (CAL2); REF 628008 (CON1); REF 628009 (CON2)
10. Água destilada
11. Agitador rotativo ou de vórtex com adaptador para placas
12. Placas com filtro Millipore Multiscreen
REF 888633 Millipore MSBV1210/MSBVN1250/MABVN1210/MABVN1250
13. Tubo de aspiração Multiscreen
REF 888315 Millipore MAVM0960R; Qiagen 19504; Pall 5017
14. Microcentrifugadora
15. Ficheiro de modelo de aquisição Luminex (IDT/LXT) específico do lote
Ficheiro IDT para uso com IS 2.3
Ficheiro LXT para uso com xPONENT3.1
16. Arquivo de lotes específicos Folha de Dados Eletrônicos (EDS); disponível no site.
17. Instrumento Luminex com software IS 2.3 ou xPONENT 3.1; www.immucor.com
18. PFS Plate Format Sheet (folha de disposição da placa)
19. PACD CD de anticorpos antiplaquetas
Software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT! v1.0.1
Manual do utilizador do software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT!; www.immucor.com
Guia de consulta rápida do software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT!; www.immucor.com

Procedimento de teste

1. Transfira o modelo de aquisição Luminex específico do lote (ficheiro IDT/LXT) do website (www.immucor.com) e guarde-o no computador ligado ao instrumento Luminex. Anote a localização do ficheiro guardado. Este ficheiro será importado para o instrumento Luminex numa fase posterior.
2. Deixe todos os reagentes, exceto o Conjugado concentrado e o Conjugado diluente, atingirem a temperatura ambiente (21 °C a 24 °C) antes da utilização.

3. Reconstitua a mistura de Microesferas liofilizada, conforme indicado na tabela 1, mais abaixo.

O número de frascos fornecido na tabela 1 inclui volume suficiente para analisar um controlo positivo e um controlo negativo em conjunto com o número de amostras indicado na coluna 1.

Tabela 1

Número de amostras	Frasco(s) de Grânulos liofilizada
1-4	1
5-10	2
11-16	3

- a. Adicione 275 µl de diluente de Microesfeas a cada frasco de Microesferas liofilizadas. Deixe que o frasco reconstituído fique à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos.
- b. Nesta altura, **não** misture nem agite no agitador de vórtex as Microesferas liofilizadas com o diluente de Microesferas.
- Os frascos reconstituídos podem ser conservados entre 2 °C e 8 °C, em local escuro, durante um período máximo de 15 dias.

ATENÇÃO: NÃO AGRUPAR FRASCOS RECONSTITUÍDOS EM DIAS DIFERENTES NUM SÓ FRASCO.

ATENÇÃO: NÃO MISTURAR AS MICROESFERAS NO AGITADOR DE VÓRTEX EM NENHUMA ALTURA DO ENSAIO PARA EVITAR A FORMAÇÃO DE ESPUMA.

4. Prepare as amostras, misturando-as no agitador de vórtex. Centrifugue a uma velocidade $\geq 10\ 000$ x g durante pelo menos 60 segundos para sedimentação de eventuais partículas insolúveis antes da utilização.
5. Registe as informações da amostra na folha de disposição da placa. Poderá fazer a transferência desta folha a partir do website (www.immucor.com).
6. Cubra os poços da placa com filtro sem amostras com um selante de placas.
7. Adicione 250 µl de Solução Tampão aos poços atribuídos.
- a. Deixe o Solução Tampão repousar nos poços pelo menos durante 3 minutos.
- b. Retire o Solução Tampão, aspirando suavemente com o tubo de aspiração. (Consulte as recomendações do fabricante para uma utilização correta.)
8. Misture as Microesferas reconstituídas, pipetando para cima e para baixo cerca de 15 a 20 vezes para **evitar a formação de espuma**.
9. Adicione 40 µl de Microesferas reconstituídas a cada poço de teste da placa com filtro. Certifique-se de que as Microesferas reconstituídas são misturadas durante a adição das Microesferas à placa com filtro. Pipete para cima e para baixo 2 a 3 vezes após a distribuição em cada 2 a 3 poços.
- ATENÇÃO:** É importante manter as esferas ressuspensas com o objetivo de garantir a adição uniforme das esferas aos poços. Se não misturar intermitentemente as esferas, elas ficarão assentes no fundo do frasco. Isto terá como resultado a distribuição de diferentes quantidades de esferas nos poços, que poderá afetar os tempos de execução e a análise dos resultados.
10. Adicione 10 µl de soro do doente ou de soro controlo, consultando a folha de disposição da placa.
11. Volte a colocar as porções não usadas de soros de controlo e esferas na refrigeração, entre 2 °C e 8°C, em local escuro, para utilização futura.
12. Cubra a placa com um selante de placas.
13. Incube durante 60 minutos à temperatura ambiente (21 °C a 24 °C), em local escuro, numa plataforma rotativa (aproximadamente 200 rotações por minuto) ou num agitador de vórtex com um conjunto de adaptador para placas numa velocidade que permitirá a mistura adequada sem entornar as amostras.
- a. Durante esta incubação, deixe que o Conjugado concentrado e o Conjugado diluente atinjam a temperatura ambiente (21 °C a 24 °C).
- b. Durante esta incubação, aqueça e prepare o instrumento Luminex.

- c. Configure o ensaio no instrumento Luminex, utilizando o ficheiro IDT específico do lote (modelo de aquisição) transferido do website (www.immucor.com). Consulte o manual do software Luminex sobre como adicionar/importar um ficheiro modelo para o software.

NOTA: Quando utilizando o modo “Automated Batch Setup” utilize como referência o manual do software MATCH IT que se encontra no CD **PACD** de instalação de Anticorpos Antiplaquetarios ou no sitio da internet (www.immucor.com).

ATENÇÃO: A não utilização do ficheiro IDT/LXT correto resultará na recolha de dados fora de sequência e na captura incorreta ou incompleta dos dados do ensaio a partir do instrumento Luminex.

14. Prepare o concentrado de conjugado diluído, misturando os volumes de Conjugado concentrado (- CCX) e Conjugado diluente (- CDX), conforme indicado na tabela 2, mais abaixo. Os volumes apresentados na Tabela 2 incluem volume suficiente para incluir um controlo positivo e um controlo negativo juntamente com o número de amostras apresentadas na primeira coluna.

O número de frascos fornecido na tabela 2 inclui volume suficiente para analisar um controlo positivo e um controlo negativo em conjunto com o número de amostras indicado na coluna 1.

- a. Cubra o conjugado diluído com película metalizada ou conserve-o em local escuro, à temperatura ambiente até ser utilizado.
- b. Volte a colocar as porções não usadas de Conjugado concentrado e Conjugado diluente na refrigeração, entre 2 °C e 8°C, em local escuro, para utilização futura.

Tabela 2

Número de amostras	Volume de CCX (µl)	Volume de CDX (µl)
1	20,0	180,0
2	25,0	225,0
3	30,0	270,0
4	35,0	315,0
5	40,0	360,0
6	45,0	405,0
7	50,0	450,0
8	55,0	495,0
9	60,0	540,0
10	65,0	585,0
11	70,0	630,0
12	75,0	675,0
13	80,0	720,0
14	85,0	765,0
15	90,0	810,0
16	95,0	855,0

15. Após 60 minutos de incubação, retire o selante de placas e adicione 200 µl de Solução Tampão a cada poço. Retire o Solução Tampão, aspirando suavemente com o tubo de aspiração.

ATENÇÃO: uma força de aspiração excessiva poderá fazer com que as esferas adiram à membrana, o que poderá resultar em falha da amostra. Aplique a pressão de aspiração **mínima** necessária para aspirar as amostras. Consulte o manual de instruções do fabricante para mais informações de como usar as placas de filtro e o aparelho de vácuo.

16. Adicione 250 µl de Solução Tampão a cada poço e aspire. Repita mais duas vezes.

ATENÇÃO: a falha na lavagem completa poderá reduzir a capacidade do conjugado detetar a IgG ligada a esferas sensibilizadas.

17. Adicione 50 µl de conjugado diluído a cada poço. Tape com um selante de placas. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (entre 21 °C e 24 °C), em local escuro, numa plataforma rotativa (aproximadamente 200 rotações por minuto) ou num agitador de vórtex com um conjunto de adaptador para placas numa velocidade que permitirá a mistura adequada sem entornar as amostras. Não guarde conjugado diluído para uso futuro.

18. Retire o selante de placas. Adicione 150 µl de Solução Tampão a cada poço que contém a amostra. Volte a colocar as porções não usadas do Solução Tampão na refrigeração, entre 2 °C e 8°C, para utilização futura.

19. Recolha de imediato os dados com o instrumento Luminex utilizando as instruções do fabricante.

OBSERVAÇÃO: é necessário recolher um mínimo de 60 eventos por região de esfera.

CONTROLO DE QUALIDADE

Os soros controle, positivo e negativo, servem como controles de ensaio externos e devem ser incluídos em cada teste. O soro de controle positivo é preparado a partir de doadores disponíveis e podem mudar com cada lote de Pak Lx. O soro controle positivo deve ter um resultado positivo citado para esses anticorpos, relatados no Certificado de Controle de Qualidade. O soro controle negativo deve ter um resultado negativo citado para quaisquer esfera HPA, GPIV ou HLA Classe I. Se estes requerimentos não forem cumpridos, as amostras afetadas devem ser consideradas inválidas.

O controle de qualidade do Pak Lx assay está embutido no sistema pela inclusão de quatro esferas de controle, (uma esfera de controle positivo e três esferas de controle negativo). A esfera de controle positivo é revestida com IgG humana e deve fornecer valores de MFI ≥ 10.000 com o soro controle negativo. Se forem obtidos valores ,com o soro de controle negativo, <10.000 MFI, o ensaio pode ter sido insuficientemente lavado ou o conjugado pode estar comprometido. As amostras podem apresentar uma grande variedade de reatividade com a esfera de controle positivo , mas devem produzir um sinal ≥ 3500 MFI. Se estes requerimentos não forem cumpridos, as amostras afetadas devem ser consideradas inválidas.

A interpretação dos dados da amostra é baseado em ter um número mínimo de cada bead recolhido durante um ensaio. Quando poucos beads são adquiridos para uma amostra, um "Bead Failure"(Erro Bead) é anotado e todos os resultados de anticorpos para a amostra afetada são consideradas inválidas

Por favor, consulte a seção de solução de problemas destas instruções para obter mais detalhes

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Interpretação pelo software: É necessário o software de anticorpos antiplaquetas MATCHIT! v1.0.1 para a interpretação dos resultados. Para a análise, é necessário um ficheiro EDS específico do lote, que está disponível para transferência no website (www.immucor.com).

Determinação da reatividade de cada esfera: Para determinar se uma esfera específica de um antigénio é positiva ou negativa, a MFI da esfera específico desse antigénio é dividida pela MFI de cada esfera de controlo negativo (CON1, CON2, CON3), produzindo três rácios para cada esfera específica de um antigénio. Observação: quando a MFI de qualquer esfera CON for inferior ao "cutoff" mínimo (Minimum Cutoff — MC), então esse "cutoff" é utilizado no cálculo. A partir dos três rácios calculados, um rácio predeterminado, o fator de ajuste do fundo (Background Adjustment Factor - BAF), é subtraído de cada combinação de esfera específica de antigénio/controlo para obter três rácios ajustados.

- Um valor positivo para dois ou mais dos três rácios ajustados indica uma reação positiva da esfera.
- Um valor negativo para dois ou mais dos três rácios ajustados indica uma reação negativa da esfera.

Interpretação dos resultados: Consulte o relatório do software MATCHIT! para saber os resultados. A tabela seguinte mostra os possíveis resultados que poderão ser obtidos ao testar uma determinada amostra.

Antigénio	GPIV	HLA Classe I	HPA-1, -3, -4 (GPIIb-IIIa)	HPA-2 (GPIb-IX)	HPA-5 (GPIa-IIa)
Resultado possível	Pos. Neg.	Pos. Neg.	Reactivo Neg.	Pos. Neg. Indeterminado	Pos. Neg. Indeterminado

- Os resultados para HLA Classe I, GPIV, HPA-2 e HPA-5 são apresentados diretamente pelo software MATCHIT!
- Quaisquer resultados indeterminados para HPA-2 e HPA-5 devem ser repetidos utilizando o ensaio Pak Lx ou um método alternativo.
- Para determinar a reatividade do HPA-1, -3 e -4, utilize a tabela seguinte:

HPA Microesferas Revestidas	Padrão de reatividade das esferas**					
HPA – 1a-3a-4a	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
HPA – 1a-3b-4a	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
HPA – 1b-3a-4a	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
HPA – 1b-3b-4a	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
HPA – 1ab-3ab-4a	Pos.*	Pos.*	Pos.*	Pos.*	Pos.*	Neg.
HPA - 1a-3ab-4b	Pos.	Neg.	Pos.*	Pos.*	Neg.*	Pos.
Interpretação dos resultados	Anticorpos anti-HPA-1 detetados		Anticorpos anti-HPA-3 detetados		Anticorpos anti-HPA-4 detetados	
Este padrão pode mascarar a presença de um anticorpo reativo com:	HPA-4b	HPA-4b not masked	HPA-4b	HPA-4b	HPA-1a, -1b, -3a, -3b	HPA-1a, -1b, -3a, -3b not masked

* As esferas heterozigóticas podem ser positivas ou negativas, dependendo do título de anticorpos na amostra ou do nível de fundo nas esferas de controlo negativas.

**Qualquer outro padrão não representado na tabela, acima apresentada, deverá ser considerado como um resultado indeterminado que se pode dever à presença de auto-anticorpos ou a uma combinação de auto- e alo- anticorpos. Tal facto pode também ficar a dever-se à reatividade de variantes polimórficas não identificadas neste teste.

LIMITAÇÕES

- Este produto não foi concebido para detetar anticorpos da classe de imunoglobulinas IgA ou IgM.
- Os resultados deste ensaio não devem ser utilizados como o único critério para uma decisão clínica. Um teste positivo apenas indica a presença de anticorpos específicos do HLA Classe I, GPIV ou HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4 e HPA-5, e não se destina a diagnosticar uma condição clínica.¹⁹⁻²¹
- Os sistemas HPA ocorrem em diferentes frequências em diferentes populações. Os sistemas HPA com frequência mais elevada são considerados “públicos”, enquanto os sistemas HPA de frequência mais baixa são considerados “privados”. O ensaio Pak Lx utiliza glicoproteínas capturadas em dadores cuja tipagem só foi feita para os sistemas de HPA públicos: HPA-1, -2, -3, -4 e -5. Três destes sistemas HPA públicos (HPA-1, -3, -4) são expressos na mesma glicoproteína, GPIIb/IIIa.^{1,5,11,14} As amostras de soro podem ter anticorpos contra um ou mais destes sistemas HPA públicos, e a presença de anticorpos contra um sistema de HPA pode mascarar a presença de anticorpos contra outros sistemas. Por exemplo, a presença de um elevado título de anticorpo reativo com um epítipo HPA-4 poderá mascarar a presença de títulos de anticorpos mais baixos reativos a um dos epítipos HPA-1. Por favor, consulte a secção Interpretação de resultados destas instruções de utilização para obter mais pormenores.
- O ensaio Pak Lx utiliza glicoproteínas capturadas de dadores cuja tipagem para sistemas HPA privados não foi feita. As amostras de soro podem ter anticorpos contra ou mais destes sistemas HPA privados. A presença destes anticorpos contra epítipos privados poderá simular os padrões de reatividade que indicariam a presença de um anticorpo reativo com um epítipo HPA público e/ou originar resultados indeterminados.
- Alguns anticorpos de baixo título e baixa avidéz, incluindo anticorpos contra antígenos HLA Classe I com baixa incidência poderão não ser detetadas por este produto.
- Este ensaio não foi validado para utilização na deteção de autoanticorpos.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Soro de controle positivo mostra reatividade adicional de anticorpos não indicado no certificado QC	Controle Positivo contaminado com outra amostra	Usuário deve empregar boas técnicas de laboratório incluindo métodos de alíquotas adequadas para eliminar a transição de amostras para poços adjacentes; Repetir o ensaio
	Pouca lavagem.	Repetir o ensaio seguindo instruções de lavagem.
Soro Controle Negativo mostra anticorpo reativo	Reagentes contaminados	Usuário deve empregar boas técnicas de laboratório incluindo métodos de alíquotas adequadas para eliminar a transição de amostras para poços adjacentes; Repetir o ensaio
	Pouca lavagem	Repetir o ensaio seguindo instruções de lavagem
Para o Soro Controle Negativo, o valor de MFI no bead de controle positivo (Probe 77) é <10.000	Descoloração do Conjugado.	Usar novo kit. Repetir o ensaio.
	Pouca lavagem	Repetir o ensaio seguindo instruções de lavagem
Para as amostras de teste, o valor MFI no Controle Bead Positivo (Probe 77) é <3.500	Descoloração do Conjugado.	Usar novo kit. Repetir o ensaio
	Pouca lavagem	Reteste a amostra seguindo as instruções de lavagem
Valores das MFI de beads de antígenos são cerca de 30 MFI enquanto Controle Positivo bead MFI é > 10.000	Amostra não adicionada	Reteste a amostra

Falha Bead (eventos bead insuficientes contados) (<60 eventos coletados)	Beads não foram bem misturados ou ressuspensos	Misturar bem com pipeta para ressuspender completamente os beads; Teste novamente a amostra
	Instrument failures - out of calibration Falha do instrument, sem calibração	Consulte o Manual do Instrumento; Repetir o ensaio
	Falhas do instrumento - o fluxo da amostra bloqueada	Consulte o Manual do Instrumento; Repetir o ensaio
	Photobleached beads Descoloração do beads	Use novo kit. Repita o ensaio
	Vacuum pressure too strong/beads stuck to membrane Pressão de vácuo muito forte / beads presos a membrana	Reduza a pressão do vácuo. Reteste a amostra.
Resultados sem interpretação.	Uso de arquivo incorreto ou aquisição modelo (IDT / LXT)	Verifique se o número do lote no arquivo IDT / LXT utilizado para a aquisição de dados corresponde ao kit Pak Lx usado para testes. Se estiver incorreto, repita o teste e aquisição de dados usando o arquivo IDT / LXT correta.
	Uso de arquivo incorreto EDS (BAF) para realizar a análise por matchit! Software Anticorpo de plaquetas	Verifique se o número do lote no arquivo EDS utilizado para a análise de dados corresponde ao kit Pak Lx usado para testes. Se estiver incorreto, repita a análise de dados usando o arquivo EDS correto.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO

Quando os kits Pak Lx forem utilizados de acordo com o procedimento descrito, os resultados revelam a presença ou ausência de anticorpos IgG contra HPA, GPIV e HLA. Nas tabelas seguintes é indicada a co-positividade (sensibilidade), a co-negatividade (especificidade) e a concordância para os números de amostras testadas para anticorpos reativas com cada HPA ou GPIV, em comparação com resultados obtidos utilizando a imobilização de anticorpos monoclonais de antigénios plaquetários (MAIPA); ou anticorpos reativos com o HLA Classe I quando comparado com os resultados obtidos com o ensaio LifeScreen Deluxe (LMX). Estes dados foram compilados de dois estudos clínicos realizados nos Sanquin Diagnostic Services (Amsterdão, Países Baixos) e no The Blood Center of Wisconsin (Milwaukee, Wisconsin, EUA).

MAIPA (HPA-1)

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	52	2	54
Negativo	0	292	292
Total	52	294	346

Concordância:	99,4%	Intervalo de confiança de 95% =	97,9%–99,8%
Co-positividade:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	93,1%–100,0%
Co-negatividade:	99,3%	Intervalo de confiança de 95% =	97,6%–99,8%

MAIPA (HPA-2)

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	8	0	8
Negativo	1	336	337
Total	9	336	345

Concordância:	99,7%	Intervalo de confiança de 95% =	98,4%–99,1%
Co-positividade:	88,9%	Intervalo de confiança de 95% =	56,5%–98,0%
Co-negatividade:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	98,9%–100,0%

MAIPA (HPA-3)

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	4	0	4
Negativo	2	341	343
Total	6	341	347

Concordância:	99,4%	Intervalo de confiança de 95% =	97,9%–99,8%
Co-positividade:	66,7%	Intervalo de confiança de 95% =	30,0%–90,3%
Co-negatividade:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	98,9%–100,0%

MAIPA (HPA-4)

	Positivo	Negativo	Total
Ensaio Pak Lx (HPA-4) Positivo	4	0	4
Negativo	0	160	160
Total	4	160	164

Concordância:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	97,7%–100,0%
Co-positividade:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	51,0%–100,0%
Co-negatividade:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	97,7%–100,0%

MAIPA (HPA-5)

	Positivo	Negativo	Total
Ensaio Pak Lx (HPA-5) Positivo	29	1	30
Negativo	2	297	299
Total	31	298	329

Concordância:	99,1%	Intervalo de confiança de 95% =	97,4%-99,7%
Co-positividade:	93,5%	Intervalo de confiança de 95% =	79,3%-98,2%
Co-negatividade:	99,7%	Intervalo de confiança de 95% =	98,1%-99,9%

MAIPA (GPIV)

	Positivo	Negativo	Total
Ensaio Pak Lx (GPIV) Positivo	5	0	5
Negativo	1	162	163
Total	6	162	168

Concordância:	99,4%	Intervalo de confiança de 95% =	96,7%–99,9%
Co-positividade:	83,3%	Intervalo de confiança de 95% =	43,6%-97,0%
Co-negatividade:	100,0%	Intervalo de confiança de 95% =	97,7%-100,0%

LMX (HLA CI-I)

	Positivo	Negativo	Total
Ensaio Pak Lx (HLA CI-I) Positivo	67	1	68
Negativo	3	104	107
Total	70	105	175

Concordância:	97,7%	Intervalo de confiança de 95% =	94,3%–99,1%
Co-positividade:	95,7%	Intervalo de confiança de 95% =	88,1%–98,5%
Co-negatividade:	99,0%	Intervalo de confiança de 95% =	94,8%-99,8%

Precisão

O ensaio Pak Lx mostrou 100% de concordância em resultados apresentados para oito amostras, quando testadas com um lote em duplicado durante mais de 20 eventos de teste separados, realizados por dois operadores. As amostras selecionadas tiveram uma reatividade de anticorpos contra HPA-1a, -1b, -3a, -4a, -5b, GPIV e HLA Classe I.

Substâncias interferentes

Foram realizados estudos sobre substâncias interferentes utilizando a norma de testes de interferência em química clínica EP07-A2 do CLSI; norma aprovada.

Estas substâncias não demonstraram interferir com o ensaio Pak Lx nas concentrações indicadas:

Hemoglobina	≤ 500 mg/dl
Triglicéridos	≤ 500 mg/dl
Bilirrubina	≤ 20 mg/dl

BIBLIOGRAFIA

1. Mueller-Eckhardt C, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363-366.
2. Mueller-Eckhardt C. Platelet allo-and autoantigens and their clinical implications. In: Nance SJ eds. *Transfusion Medicine in the 1990s*, Arlington, Va., American Association of Blood Banks 1990; 63-93.
3. Brand A. Immunological aspects of blood transfusions. *Transpl.Immunol.* 2002;10:183-190.
4. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. *Transfus.Apher.Sci.* 2003;28:297-305.
5. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2004;44:1220-1225.
6. Rebutta P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica* 2005;90:247-253.
7. Kanhai HH, Porcelijn L, Engelfriet CP et al. Management of alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang.* 2007;93:370-385.
8. Stroncek DF, Rebutta P. Platelet transfusions. *Lancet* 2007;370:427-438.
9. Arnold DM, Smith JW, Kelton JG. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus.Med.Rev.* 2008;22:255-267.
10. Bussel JB, Primiani A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates. *Blood Rev.* 2008;22:33-52.
11. Curtis BR, McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. *Immunohematology.* 2009;25:125-135.
12. Vassallo RR. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients. *Immunohematology.* 2009;25:119-124.
13. Kaplan C, Ni H, Freedman J. Alloimmune Thrombocytopenia. In: Michelson A eds. *Platelets 3rd Edition.* Academic Press – Elsevier. 2012; 46:953-970.
14. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl.Immunol.* 2002;10:165-181.
15. Metcalfe P et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang.* 2003; 85:240.
16. Santoso S. Human platelet alloantigens. *Transfus.Apher.Sci.* 2003;28:227-236.
17. Saw CL, Szykoluk H, Curtis BR et al. Two cases of platelet transfusion refractoriness associated with anti-CD36. *Transfusion* 2010;50:2638-2642.
18. Klein J, Sato A. The HLA system. *N Eng J Med.* 2000; 343:702.
19. Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, Pearson HA. Report on the 14th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. *Vox Sang.* 2010;99:375-381.
20. Smith GA, Ranasinghe E, Ouwehand WH. The importance of using multiple techniques for detection of platelet antibodies. *Vox Sang.* 2007;93:306-308.
21. Metcalfe P. Ensuring quality in platelet immunology. *Vox Sang.* 2007;93:287-288.



Immucor GTI Diagnostics, Inc.
20925 Crossroads Circle
Waukesha, WI 53186 EUA



Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26A
Rodermark 63322
Germany

Contactos nos EUA e internacionais:

Assistência Técnica: waukeshatechsupport@immucor.com

www.immucor.com

LUMINEX e xMAP são marcas comerciais da Luminex Corporation.

MATCHIT!, Pak Lx, Immucor e logótipos associados são marcas comerciais e/ou marcas registadas da Immucor e/ou das respetivas filiais nos EUA e/ou em outros países.

©2012-2015 Immucor GTI Diagnostics, Inc.

303285.IFUPT Rev. F
2015-05-29

Warning	Atenção
H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P272	A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P302 + P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
P333 + P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
P501	Eliminar o conteúdo / recipiente em uma instalação de eliminação de resíduos aprovado.