

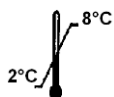


Ensaio PakPlus®

REF PAKPLUS

IVD

CE



SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| UTILIZAÇÃO | 2 |
| SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO | 2 |
| PRINCÍPIO | 2 |
| REAGENTES | 2 |
| PRECAUÇÕES | 3 |
| ATENÇÃO | 3 |
| COLHEITA DA AMOSTRA | 3 |
| PROCEDIMENTO | 3 |
| Material Fornecido | 3 |
| Material Adicional Necessário | 4 |
| Procedimento do Teste | 4 |
| CONTROLO DE QUALIDADE | 6 |
| INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS | 6 |
| LIMITAÇÕES | 7 |
| CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO | 7 |
| REFERÊNCIAS | 9 |
| TRADUÇÃO DE SIMBOLOS | 11 |

UTILIZAÇÃO

O ensaio PakPlus é um imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para pesquisa de anticorpos para HLA Classe I e antígenos de glicoproteínas plaquetárias (FP) IV e para epitopos polimorfos nas glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa, Ib/IX e Ia/IIa.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

A existência de antígenos específicos de plaquetas em várias glicoproteínas plaquetárias tem sido descrita por muitos investigadores.¹⁻⁵ Os anticorpos para antígenos específicos de plaquetas ou antígenos HLA classe I devidos a uma gravidez ou transfusão prévias podem resultar na imuno-destruição das plaquetas transfundidas.⁶⁻¹⁸ A confirmação da presença destes anticorpos em amostras de doentes pode ser útil na procura de produtos sanguíneos potencialmente compatíveis.

Os micropoços do ELISA de fase sólida de PakPlus estão cobertos por glicoproteínas plaquetárias IIb/IIIa e Ia/IIa capturadas com anticorpos monoclonais obtidas a partir de três dadores do grupo O de tipo plaquetário conhecido. As moléculas HLA classe I e as glicoproteínas plaquetárias Ib/IX e IV são fornecidas como glicoproteínas purificadas por afinidade. O teste é concebido para detectar e diferenciar entre anticorpos para antígenos HLA classe I e antígenos específicos de plaquetas. A configuração dos micropoços pode ser encontrada na Folha de Registo.

PRINCÍPIO

O soro ou plasma do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com glicoproteínas plaquetárias e moléculas HLA 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/A/M) aos poços e incuba-se. O material não ligado Anti-IgG/A/M é lavado e adiciona-se o substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Após um período de incubação de 30 minutos, a reacção é parada com solução de paragem. A densidade óptica da cor que se desenvolve é medida num espectrofotómetro.

REAGENTES

Número máximo de testes por kit:

- **PAKPLUS: 5 testes por kit**

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

| | REF | |
|------------|--------|---|
| MS | 404553 | Tiras de micropoços: tiras de micropoços de base achatada aos quais foram imobilizadas glicoproteínas plaquetárias e HLA. Os micropoços encontram-se em sacos de alumínio resseláveis. Prontos a usar. |
| TCW | 403622 | Solução de Lavagem Concentrada (10X): Solução Tris (hydroxi-metil-amino-metano) 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 | 403831 | Diluyente de Amostra: Solução salina Fosfato tamponada contendo albumina bovina e soro de ratinho. Azida sódica 0.1%. Pronto a usar. |
| SB | 403613 | Tampão Substrato: Esta solução contém dietanolamina e cloreto de magnésio. Azida sódica 0.02%. Pronto a usar. Proteger da luz. |
| ESS | 403603 | Solução de Paragem: Pronta a usar. |
| AH | 404589 | Conjugado IgG/A/M anti-humano: anticorpo de cabra purificado por afinidade conjugado a fosfatase alcalina para a imunoglobulina humana (IgG/A/M). Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluyente de Amostra antes de usar. |
| PN | 403594 | 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 | 404601 | Soro Controlo Positivo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluyente de Amostra antes de usar. |

NC

404577 Soro Controlo Negativo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostra antes de usar.

PS

503019 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 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.
- Quando utilizar uma estufa, para os passos de incubação, tenha em atenção a limitação de abertura/ fecho da porta para evitar variações de temperatura interna.
- 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.

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.
- Deitar fora todos os componentes, quando usados, de acordo com os regulamentos locais.

COLHEITA DA AMOSTRA

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. O soro deve ser separado dos eritrócitos ao ser armazenado ou transportado. 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 –80°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 divididas em pequenos volumes e então congeladas.

Partículas ou agregados na amostra podem causar resultados falso-positivos ou fracos valores em duplicado. As amostras com este tipo de partículas de material devem ser centrifugadas antes de serem testadas.

PROCEDIMENTO

Material Fornecido

Os frascos podem conter mais reagente do que o descrito nas etiquetas. Assegure-se da correcta medição dos reagentes através da utilização de um dispositivo apropriado, quando fizer as diluições.

1. 6 – 2 x 8 Tiras de micropoços com suporte
2. 1 x 50 mL Solução de Lavagem Concentrada (10X)
3. 1 x 14 mL Diluente de Amostra
4. 1 x 14 mL Tampão Substrato
5. 1 x 14 mL Solução de Paragem
6. 1 x 80 µL Conjugado IgG/A/M Anti-Humano
7. 3 x 50 mg Substrato PNPP
8. 1 x 0.3 mL Soro Controlo Positivo
9. 1 x 0.7 mL Soro Controlo Negativo
10. 6 Seladores de Placa

Material Adicional Necessário

1. Tubos de ensaio de polipropileno 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 de água
 - Intervalo de temperatura 37°C ± 1°C
11. Folha de registo específica para cada lote – “Recording Sheet”, disponível no website (www.immucor.com)
12. Toalhetas humedecidas de laboratório

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 testar. Utilizar a Folha de Registo para designar cada amostra a uma localização de duas colunas (duplicado). Registrar a identificação de cada amostra na Folha de Registo.

Preparação das Amostra e Controlos

4. Diluir as amostras e os controlos em Diluente da Amostra conforme descrito na tabela seguinte. Misturar bem:

| | Volume de Diluente de Amostra (SD) | Volume de Amostra |
|---------|------------------------------------|-------------------|
| PC | 150 µL | 50 µL |
| NC | 600 µL | 200 µL |
| Amostra | 600 µL | 200 µL |

5. Remover os micropoços e o suporte do saco. Resselar as tiras que não forem necessárias no saco de protecção.

NOTA: O kit apenas fornece um suporte. 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. Durante a execução do teste, mantenha a mesma orientação da placa.

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 diluída aos respectivos poços na Folha de Registo. Remover qualquer espuma dos micropoços, tendo o cuidado de não haver contaminação entre amostras.

NOTA: Não adicionar amostras ou reagentes aos poços branco.

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

9. Selar os micropoços com o selador de placas e incubar.
 - 30 minutos em banho de água a 37°C, ou
 - 40 minutos na incubadora a 37°C
10. Diluir o Conjugado 1:100 em Diluente de Amostra conforme descrito na tabela seguinte. Utilizar um recipiente de polipropileno.

| # Tiras | AH | SD |
|-----------|-------|--------|
| 2 – 2 x 8 | 20 µL | 2.0 mL |
| 6 – 2 x 8 | 60 µL | 6.0 mL |

NOTA: 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 inverter em papel absorvente.
 - b) Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
 - c) Aspirar ou decantar.
 - d) Repetir os passos b + c para um total de 4 lavagens.
 - e) Decantar vigorosamente para remover qualquer Solução de Lavagem residual. Inverter em papel absorvente para evitar a secagem.
12. Adicionar 50 µL de Conjugado diluído (feito num passo anterior) a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO. Remover qualquer espuma dos micropoços.
13. Selar os micropoços com o selador de placa e incubar:
- 30 minutos em banho de água a 37°C, ou
 - 40 minutos na incubadora a 37°C
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 conforme descrito na tabela seguinte.

| # Tiras | PN | SB |
|-----------|--------|---------|
| 2 – 2 x 8 | 40 µL | 4.0 mL |
| 6 – 2 x 8 | 120 µL | 12.0 mL |

Misturar bem. Proteger da luz até ser utilizado.

NOTA: Evitar a contaminação do substrato de trabalho com conjugados de passos anteriores.

16. LAVAGEM

- a) Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e inverter em papel absorvente.
 - b) Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
 - c) Aspirar ou decantar.
 - d) Repetir os passos b + c para um total de 4 lavagens.
 - e) Decantar vigorosamente para remover qualquer Solução de Lavagem residual Inverter em papel absorvente para evitar a secagem.
17. Remover qualquer espuma dos micropoços. Limpar o fundo dos poços com uma toalhita humedecida.
- Prosseguir rapidamente com os próximos três passos.
18. Adicionar 100 µL da solução PNPP diluída a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Registrar os resultados na Folha de Registo específica para cada lote.
- NOTA:** Os fenótipos dos dadores para GPIIb/IIIa (linhas A e B) podem variar entre lotes, como se verifica na Folha de Registo específica para cada lote.

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade do PakPlus é efectuado no sistema pela avaliação dos Controlos Positivo e Negativo. Esta avaliação deve ser incluída em cada teste ensaio para ajudar a determinar se ocorreram erros técnicos ou falha de reagentes.

Critério para um teste válido:

| | |
|--|--|
| Controlo Negativo (linhas IIb/IIIa) | DO Média \leq 0.175 |
| Controlo Negativo (todas as linhas) | Dentro de 35% da DO média para a linha |
| Controlo Positivo (HLA) | DO Média \geq 1.000 |

As leituras da DO obtidas para resultados de teste **Positivo** (para ambas as amostras e Controlo Positivo) devem situar-se nos 20% da média destes dois valores. Amostras com resultados fora deste limite devem ser testadas novamente. Um Controlo Positivo, com resultados fora deste limite deve ser considerado inválido e o teste repetido.

As leituras da DO para resultados duplicados no intervalo Negativo para amostras de teste podem situar-se fora dos 20% da média destes dois valores. Contudo, as leituras da DO não devem estar em nenhum limite do limiar da reactividade (cutoff) determinada para o antigénio. Tais resultados são considerados inválidos e devem ser testados novamente. As leituras duplicadas de DO para o Controlo Negativo devem estar entre 35% da média dos dois valores. Leituras com variações superiores a 35% da DO média para os dois valores devem ser consideradas inválidas e o resultado repetido.

NOTA: Duplicados fracos podem resultar de falta de reagente ou amostra, adição irregular de reagentes, temperaturas de incubação irregulares, exposição à luz na incubação final, falha na limpeza do fundo dos poços antes da leitura, ou contaminação entre poços. Não testar em duplicado pode conduzir à aceitação de resultados errados.

NOTA: O Soro Controlo Positivo contém anticorpos dirigidos a antigénios HLA Classe I. Este Controlo é uma verificação do desempenho do reagente, da técnica e do desempenho do operador. O Controlo não se destina a verificar qualquer reacção antigénio/anticorpo em particular.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Determinar o limiar da reacção (Cutoff) para cada antigénio (linha) como de seguida:

1. Calcular a DO Média dos resultados duplicados do Controlo Negativo para cada antigénio (linha).
2. Multiplicar a DO média do CN pelo Multiplicador Cutoff (listado na Folha de Registo "Recording Sheet"), e registar este valor na célula apropriada da coluna de Cutoff.

Para cada amostra, determinar o resultado de cada **antigénio** (linha) através da execução dos passos seguintes:

1. Calcular a DO média para cada par de resultados duplicados.
2. Comparar a DO média do cutoff do CN dessa linha. Estes são 2 resultados possíveis para reactividade com cada antigénio (linha) Negativo ou Positivo, que são determinados como de seguida:
 - a. Se a DO média é \leq que cutoff, o **Resultado é Negativo**.
 - b. Se a DO média é $>$ que cutoff, o **Resultado é Positivo**.
3. Determinar o resultado final para cada **glicoproteína** como se segue:
 - a. Resultado indeterminado para uma amostra: uma amostra que é Positivo para as linhas A – D e E ou F, ou ambos, é considerada indeterminada para GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX, e GPIV. Tais resultados pan-reactivos não se enquadram num padrão de especificidade alo-anticorpo, e podem indicar a presença de anticorpos, ligações não específicas ou outras causas desconhecidas.

Note que isto não se aplica para HLA Classe I.

- b. Para GPIb/IX, GPIV, e HLA Classe I (Linhas E, F, G), o resultado final é idêntico ao resultado desse antigénio (linha).
- c. Para GPIIb/IIIa:
 - Se A e B são ambos Negativo, o resultado para GPIIb/IIIa é **Negativo**.
 - Se A ou B é Positivo e o antigénio alternativo (linha) é Negativo, o resultado para GPIIb/IIIa é **Positivo**.
 - Se A e B são ambos Positivo, o resultado para GPIIb/IIIa é **Positivo**.

d. Para GPIa/IIa, consultar a tabela seguinte.

Interpretação do GPIa/IIa (Linhas C e D)

| Resultado da Linha C | Resultado da Linha D | Interpretação |
|----------------------|----------------------|--|
| Negativo | Negativo | Negativo para anticorpos dirigidos a GP Ia/IIa |
| Negativo | Positivo | Positivo para anticorpos dirigidos a GP Ia/IIa |
| Positivo | Negativo | |
| Positivo | Positivo | Positivo ou Indeterminado para anticorpos dirigidos a GPIa/IIa. Ver seguinte **. |

** Para resultados em que ambos o C e D são Positivos, dividir a média mais elevada pela menor de DO. Um rácio ≥ 3.0 deve ser interpretado como Positivo para um aloanticorpo para GPIa/IIa. Amostras com rácios < 3.0 devem ser consideradas Indeterminados para GPIa/IIa.

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.
- Este teste destina-se a ser utilizado como um teste de pesquisa. Os resultados deste ensaio não devem ser utilizados como única base para uma decisão clínica.¹⁹⁻²¹
- Alguns anticorpos de baixo título e de baixa avidéz podem não ser detectados com este ensaio.¹⁹⁻²¹
- Os anticorpos para antígenos específicos de plaquetas que não estão representados na Folha de Registo podem não ser detectados.
- A presença de outras variantes polimórficas HPA localizadas em GPIIb-IIIa (HPA-6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 19, 20, 21), GPIb/IX (HPA-12) e GPIa-IIa (HPA-13, 18) não foi determinada para os antígenos capturados nos poços do PakPlus. Os anticorpos deste sistema podem ser reactivos neste teste.
- Anticorpos para antígenos HLA classe I de baixa incidência podem não ser detectados com este produto.
- O PakPlus não foi avaliado para detecção de anticorpos dirigidos a antígenos plaquetários.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Precisão

A precisão entre ensaios foi avaliada de acordo com CLSI EP12-A2, "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline". Um conjunto de 5 amostras de soro foi testado, em duplicado, em 20 testes separadamente. Cada uma das 5 amostras continha um anticorpo para uma das 5 glicoproteínas detectadas pelo PakPlus: GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX, GPIV, e HLA Class I. Houve uma concordância de 100% de resultados qualitativos nos 20 testes para todas as amostras testadas. As variações totais dos valores de DO oscilam de %CV de 4.4 (1.139 média DO) a 14.9 (0.064 média DO), dependendo do antígeno e do intervalo de DO da amostra.

Reprodutibilidade

O estudo da reprodutibilidade foi efetuado em três locais distintos: Na Immucor GTI Diagnostics, Inc., no Blood Center of Wisconsin (Milwaukee, Wisconsin), e no Puget Sound Blood Center (Seattle, Washington). Em cada local foi testado, por dois técnicos, um painel de cinco (5) amostras com o teste PakPlus, para analisar a variação entre testes. Cada amostra apresentava reactividade para um único antígeno PakPlus e é negativa para os restantes. Cada amostra foi testada separadamente por 6 operadores (duas pessoas por local), em 20 ensaios. A tabela seguinte mostra um sumário das 5 amostras testadas em 20 diferentes ensaios pelos 6 utilizadores.

Reprodutibilidade do Pak Plus entre Utilizações

| Amostra # | Anticorpos Esperados | Testes Positivos (de 120) | % de Concordância Positiva | Testes Negativos (de 480) | % de Concordância Negativa |
|-----------|----------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 | GPIIb/IIIa (HPA-1a) | 120 | 100% | 480 | 100% |
| 2 | HLA | 120 | 100% | 480 | 100% |
| 3 | GPIV | 120 | 100% | 480 | 100% |
| 4 | GPIb/IX | 119 | 99.2% | 480 | 100% |
| 5 | GPIa-IIa (HPA-5b) | 120 | 100% | 479* | 99.8% |

*A amostra 5 obteve um único resultado falso Positivo para HLA Classe I

A variação total (Total CV) de valores DO, entre todos os operadores, varia de 7.4% (DO média = 1.379) a 26.6% (DO média = 0.048) dependendo da amostra, do antígeno e valor de DO.

Variação entre lotes

A variação entre lotes do PakPlus foi avaliada num estudo de comparação de desempenho através do teste de 5 amostras de soro, cada uma contendo um anticorpo para uma das 5 glicoproteínas detectadas pelo PakPlus: GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX, GPIV, e HLA Class I. Cada amostra foi testada com 3 lotes de PakPlus. Obteve-se 100% de concordância entre os resultados qualitativos das amostras com a utilização dos três lotes. As variações totais dos valores de DO oscilam de %CV de 1.4% (DO média = 0.827) a 20.5% (DO média = 0.067), dependendo da amostra, antígeno.

Métodos de Estudo de Comparação

O desempenho do PakPlus para detecção de anticorpos reactivos com GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPIV, e GPIa/IIa foi comparado com a detecção através do teste MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens) e do Lifecodes QuikScreen para a detecção de anticorpos de antígenos HLA Classe I. Foram conduzidos três estudos clínicos. Dois deles como estudos externos no Blood Center of Wisconsin (Milwaukee, Wisconsin), e no Puget Sound Blood Center (Seattle, Washington; teste MAIPA feito em Cruz Vermelha Australiana Kelvin Grove, Queensland, Austrália). O terceiro, estudo interno, foi feito na Immucor GTI Diagnostics utilizando amostras do Sanquin Diagnostic Services (Amesterdão, Holanda) e da Immucor GTI Diagnostics. Os dados destes estudos foram reunidos para análise. As tabelas seguintes 2x2 mostram a análise para % de concordância positiva (sensibilidade), % de concordância negativa (especificidade), e % de concordância geral para as amostras testadas. O Intervalo de Confiança 95% perto destes valores é mostrado em parênteses.

Método de Comparação: PakPlus vs. QuikScreen para detecção de anticorpos para antígenos HLA Classe I

| | | Lifecodes QuikScreen | | | | | |
|---------|----------|----------------------|----------|-------|------------------------------|--------|------------------|
| | | Positivo | Negativo | Total | | | |
| PakPlus | Positivo | 202 | 12 | 214 | % de Concordância Total: | 92.32% | (89.95 – 94.28%) |
| | Negativo | 36 | 375 | 411 | % de Concordância Positivo: | 84.87% | (79.68 – 89.18%) |
| | Total | 238 | 387 | 625 | % de Concordância Negativos: | 96.90% | (94.65 – 98.39%) |

Foram excluídas três amostras do estudo devido a resultado indeterminado ou inválido com QuikScreen.

Amostras com resultados discordantes com PakPlus comparadas com QuikScreen foram ainda avaliadas por testes com Luminex (Lifematch LMX) para detecção de anticorpos para antígenos HLA da Class I. Dos 12 positivos com 12 PakPlus – amostras negativas com QuikScreen, todas eram negativas por LMX. Dos 36 negativos com PakPlus – amostras positivas com QuikScreen, 14 eram também negativas pelo LMX.

Método de Comparação: Detecção de anticorpos para GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX, ou GPIV

A análise foi efectuada de duas formas. A tabela seguinte mostra a comparação global entre o PakPlus e o MAIPA para qualquer anticorpo HPA detectado no teste. As restantes tabelas comparam o resultado entre o PakPlus e o MAIPA para cada glicoproteína específica presente no teste PakPlus. Para ambos os tipos de análise, foram excluídas do estudo comparativo as amostras com resultados MAIPA indeterminados (alo-especificidade não pode ser determinada ou apresenta ampla reactividade em diversos alvos). O desempenho do PakPlus com essas amostras não foi avaliado.

Análise baseada em Anticorpos dirigidos a Qualquer Antígeno HPA

| | | MAIPA | | | | | |
|---------|----------|----------|----------|-------|-----------------------------|--------|------------------|
| | | Positivo | Negativo | Total | | | |
| PakPlus | Positivo | 118 | 39 | 157 | % de Concordância Total: | 91.15% | (88.27 – 93.52%) |
| | Negativo | 4 | 325 | 329 | % de Concordância Positivo: | 96.72% | (91.82 – 99.10%) |
| | Total | 122 | 364 | 486 | % de Concordância Negativo: | 89.29% | (85.65 – 92.27%) |

Foram excluídas 17 amostras da análise devido a resultados MAIPA indeterminados. Foram excluídas 9 amostras da análise devido a resultados indeterminados (pan-reactivo) no teste PakPlus. Estas amostras foram excluídas das análises subsequentes de comparação de desempenho entre PakPlus e MAIPA.

O estudo clínico do teste para GPIV foi apenas executado em um local, conforme descrito na secção seguinte “ Análise de Anticorpos” para GPIV.

Análise baseada em Anticorpos para GPIIb/IIIa

| | | MAIPA | | | | | |
|---------|----------|----------|----------|-------|-----------------------------|---------|-------------------|
| | | Positivo | Negativo | Total | | | |
| PakPlus | Positivo | 75 | 28 | 103 | % de Concordância Total: | 94.33% | (91.91 – 96.20%) |
| | Negativo | 0 | 391 | 391 | % de Concordância Positivo: | 100.00% | (95.20 – 100.00%) |
| | Total | 75 | 419 | 494 | % de Concordância Negativo: | 93.32% | (90.49 – 95.51%) |

Análise baseada em Anticorpos para GPIa/IIa

MAIPA

| | Positivo | Negativo | Total |
|-----------------|----------|----------|-------|
| PakPlus | | | |
| Positivo | 41 | 12 | 53 |
| Negativo | 4 | 411 | 415 |
| Total | 45 | 423 | 468 |

| | | |
|-----------------------------|--------|------------------|
| % de Concordância Total: | 96.58% | (94.51 – 98.03%) |
| % de Concordância Positivo: | 91.11% | (78.78 – 97.52%) |
| % de Concordância Negativo: | 97.16% | (95.10 – 98.53%) |

Verificou-se que 24 amostras eram indeterminadas pelo PakPlus devido a resultados Positivos para ambas as preparações GPIa/IIa (linhas C e D) e uma razão de média DOs < 3.0 (ver secção “Interpretação”). Estas foram excluídas do método de comparação. Todas eram negativas através de MAIPA.

Análise baseada em Anticorpos para GPIb/IX

MAIPA

| | Positivo | Negativo | Total |
|-----------------|----------|----------|-------|
| PakPlus | | | |
| Positivo | 4 | 20 | 24 |
| Negativo | 2 | 465 | 467 |
| Total | 6 | 485 | 491 |

| | | |
|-----------------------------|--------|------------------|
| % de Concordância Total: | 95.52% | (93.29 – 97.17%) |
| % de Concordância Positivo: | 66.67% | (22.28 – 95.67%) |
| % de Concordância Negativo: | 95.88% | (93.70 – 97.46%) |

Análise de Anticorpos para GPIV

O desempenho do PakPlus para detecção de anticorpos reactivos com GPIV foi comparada com a detecção com MAIPA num único estudo realizado no Blood Center of Wisconsin (Milwaukee, Wisconsin).

MAIPA

| | Positivo | Negativo | Total |
|-----------------|----------|----------|-------|
| PakPlus | | | |
| Positivo | 3 | 1 | 4 |
| Negativo | 1 | 146 | 147 |
| Total | 4 | 147 | 151 |

| | | |
|-----------------------------|--------|------------------|
| % de Concordância Total: | 98.68% | (95.30 – 99.84%) |
| % de Concordância Positivo: | 75.00% | (19.41 – 99.37%) |
| % de Concordância Negativo: | 99.32% | (96.27 – 99.98%) |

Substâncias Interferêntes

Foram efectuados estudos de substâncias interferentes usando o teste de Interferência em Química clínica, CLSI EP07-A2; *Approved Guideline*.

As substâncias seguintes mostraram não interferir no teste PakPlus, nas concentrações indicadas:

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

IVIG IgG humano purificado, utilizado como um substituto para IVIG, foi testado para interferência no teste PakPlus. No teste, ocorreram interferências significativas para concentrações de soro ≥ 200 mg/dL. Foram observados resultados indeterminados (pan-reactivo) ou positivo falso. Não foi executado o teste com concentrações < 200 mg/dL. Nos doentes que recebem terapia IVIG, os níveis mínimos são direccionados a serem mais elevados que a menor concentração testada.²²

Os resultados de pessoas que fazem terapia IVIG devem ser cuidadosamente avaliados tendo em atenção esta situação.

REFERÊNCIAS

1. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl.Immunol.* 2002;10:165-181.
2. Metcalfe P et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang.* 2003; 85:240.
3. Santoso S. Human platelet alloantigens. *Transfus.Apher.Sci.* 2003;28:227-236.
4. Saw CL, Szykoluk H, Curtis BR et al. Two cases of platelet transfusion refractoriness associated with anti-CD36. *Transfusion* 2010;50:2638-2642.
5. Klein J, Sato A. The HLA system. *N Eng J Med.* 2000; 343:702.
6. Mueller-Eckhardt C. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363-366.

7. 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.
8. Brand A. Immunological aspects of blood transfusions. Transpl.Immunol. 2002;10:183-190.
9. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. Transfus.Apher.Sci. 2003;28:297-305.
10. 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.
11. Rebullia P. A mini-review on platelet refractoriness. Haematologica 2005;90:247-253.
12. Kanhai HH, Porcelijn L, Engelfriet CP et al. Management of alloimmune thrombocytopenia. Vox Sang. 2007;93:370-385.
13. Stroncek DF, Rebullia P. Platelet transfusions. Lancet 2007;370:427-438.
14. Arnold DM, Smith JW, Kelton JG. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfus.Med.Rev. 2008;22:255-267.
15. Bussel JB, Primiani A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates. Blood Rev. 2008;22:33-52.
16. Curtis BR, McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. Immunohematology. 2009;25:125-135.
17. Vassallo RR. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients. Immunohematology. 2009;25:119-124.
18. Kaplan C, Ni H, Freedman J. Alloimmune Thrombocytopenia. In: Michelson A eds. Platelets 3rd Edition. Academic Press – Elsevier. 2012; 46:953-970.
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.
22. Goddard EA. Intravenous Immunoglobulin. Current Allergy & Clinical Immunology, March 2008 Vol 21, No. 1. 2008:26-31.



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



Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
 Robert-Bosch-Strasse 32
 63303 Dreieich
 Germany

Informações e Contactos USA e Internacional:

Suporte Técnico : waukeshatechsupport@immucor.com

www.immucor.com

© 1995-2017 Immucor GTI Diagnostics, Inc.

303469.IFUPT Rev H
 2017-07-25

| | |
|--------------------|--|
| Warning | Atenção |
| Danger | Perigo |
| H302 | Nocivo por ingestão. |
| H318 | Provoca lesões oculares graves. |
| H412 | Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. |
| EUH032 | Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. |
| P264 | Lavar bem as mãos cuidadosamente após manuseamento. |
| P270 | Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto. |
| P273 | Evitar a libertação para o ambiente. |
| P280 | Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. |
| P301 + P312 | EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. |
| P305 + P351 + P338 | SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. |
| P310 | Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. |
| P330 | Enxaguar a boca. |

TRADUÇÃO DE SIMBOLOS

| SYMBOL | ENGLISH (EN) | CHINESE (ZH) | DEUTSCH (DE) | FRANÇAIS (FR) | GREEK (EL) | ITALIANO (IT) | PORTUGUÊS (PT) | ESPAÑOL (ES) | JAPANESE (JA) |
|-----------------------|--|--------------|--------------------------------|---|--|--|---|---|---------------|
| RS | Recording Sheet | 记录单 | Protokollbogen | Tableaux de résultats | Φύλλο Καταγραφής | Foglio di lavoro | Tabela de resultados | Tabla de Resultados | 記録用紙 |
| ID # | Identification Number | 识别编号 | Identifikationsnummer | N° identification du patient | Αριθμός Ταυτότητας | Numero di identificazione | Número de identificação | Nº de identificación | 検体ID |
| DATE | Date Read | 读取日期 | Datum | Date | Ημερομηνία | Data | Data da leitura | Fecha | 検査日 |
| TECH | Technologist | 技师 | Untersucher | Technologue | Τεχνολόγος | Tecnico | Técnico | Analista | 検査者 |
| NC | Negative Control | 阴性对照 | Negative Kontrolle | Contrôle négatif (A) | Αρνητικός Ορός ελέγχου | Controllo negativo | Controlonegativo | Control negativo | 陰性コントロール |
| PC | Positive Control | 阳性对照 | Positive Kontrolle | Contrôle positif | Θετικός Ορός ελέγχου | Controllo positivo | Controllopositivo | Control positivo | 陽性コントロール |
| BLANK | Blank Well | 空白孔 | Blank | Puitsvierge | ΤΥΦΛΟ | Bianco | Poço do Branco | Pocillo del Blanco | ブランク |
| DIL | Dilute Before Use | 使用前稀释 | Vor Gebrauch verdünnen | Diluer avant utilisation | Αραιώστε πριντηνΧρήση | Diluire con acqua deionizzata prima dell'uso | Diluir antes de utilizar | Dilución | 使用前に希釈してください |
| MNCOD | Mean Negative Control OD | 平均阴性对照OD | OD-Mittelwertder NC | Moyenne des DO du contrôle négatif | Μέση τιμή OD Αρνητικού μάρτυρα | Media del Controllo Negativo OD | DO Média do Controlo Negativo | promedio de la OD del CN | |
| MPCOD | Mean Positive Control OD | 平均阳性对照OD | OD-Mittelwertder PC | Moyenne des DO du contrôle positif | Μέση τιμή OD Θετικού μάρτυρα | Media del Controllo Positivo OD | DO Média do Controlo Positivo | promedio de la OD del CP | |
| Multiplier | Cutoff Multiplier | 乘数截止数值 | Cutoff Multiplier | Multiplicateur du seuil de positivité | Πολλαπλασιαστής cutoff | Moltiplicatore Cutoff | Multiplicador de Cutoff | | |
| CUTOFF | Control Cutoff | 对照截止数值 | CUTOFF der Kontrolle | Seuil de positivité du contrôle | Μαρτυρας cutoff | Controllo Cutoff | Controlo Cutoff | Cutoff (corte) | |
| OD 1 | Optical Density 1 | 光密度1 | Optische Dichte 1 | Densité optique 1 | Οπτική πυκνότητα 1 | Densità ottica 1 | Densidade Óptica 1 | Densidad Óptica 1 | |
| OD 2 | Optical Density 2 | 光密度2 | Optische Dicht 2 | Densité optique 2 | Οπτική πυκνότητα 2 | Densità ottica 2 | Densidade Óptica 2 | Densidad óptica 2 | |
| ROW A | Row A | A行 | Reihe A | Rangée A | Γραμμή A | Riga A | Linha A | Fila A | |
| ROW B | Row B | B行 | Reihe B | Rangée B | Γραμμή B | Riga B | Linha B | Fila B | |
| MEAN | Mean Sample OD | 平均样品 OD | Mittelwert OD der Probe | Moyenne des DO de l'échantillon | Μέση OD δείγματος | Media Campione OD | DO Média da Amostra | Media | |
| INTRP | Interpretation | 说明 | Interpretation | Interprétation | Ερμηνεία | Interpretazione | Interpretação | Interpretacion | |
| VALID | Controls meet criteria for valid assay | 对照符合有效测定标准 | Kontrollen valide für den Test | Les contrôles rencontrent les critères de validité de l'essai | Ο έλεγχος πληρεί τα κριτήρια για έγκυρη μέθοδο | I controlli corrispondono ai requisiti richiesti per la validazione del test | Controlos satisfazem os critérios de validação do teste | Resultados de los controles para un ensayo valido | |
| RSLT | Result | 结果 | Ergebnis | Résultat | Αποτέλεσμα | Risultato | Resultado | Resultados | |
| DUP OK | Duplicate Variation Acceptable | 可接受的重复变化 | Doppelbestimmung sind ok | Variation des analyses en double acceptable | Αποδεκτή διακύμανση εις διπλούν | Variazione accettabile dei duplicati | Variação Duplicada Aceitável | Variación duplicada aceptable | |
| TEMPLATE | Plate Template | 平皿模板 | Plattenbelegung | Modèle de la plaque | Μήτρα πλάκας | Modello di piastra | Template | Template/Plantilla | |
| CALCS | Control calculations | 对照计算 | Berechnungen der Kontrolle | Calculs de contrôle | Υπολογισμός ελέγχου | Calcoli di controllo | Cálculos de control | Calculos control | |
| SAMPLE RESULTS | Sample Results | 样品结果 | Ergebnis der Probe | Résultats des échantillons | Αποτελέσματα δειγμάτων | Risultati del campione | Resultdos da Amostra | Resultados | |
| SAMPLE | Sample | 样品 | Probe | Échantillon | Δείγμα | Campione | Amostra | Muestra | |
| CONTROLS | Controls | 对照 | Kontrollen | Contrôles | Μάρτυρες | Controlli | Controlos | Controles | |
| RVW | Reviewed by | 审核 | Gegengelesen durch | Revu par | Ανασκόπηση από | Controllato da | Revisto por | Revisado por | |