

INSTRUÇÕES DE USO

LABSCREEN

1. USO PRETENDIDO

Os produtos LABScreen destinam-se a serem utilizados na detecção do anticorpo HLA por meio de citometria de fluxo.

PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO

2. INTRODUÇÃO

Os produtos LABScreen são *beads* revestidas com antígenos HLA de Classe I ou Classe II e reagentes previamente otimizados para a detecção de anticorpos HLA de Classe I ou Classe II no soro humano. Os produtos LABScreen utilizam o LABScan™ 100 (Luminex® 100/200) ou LABScan3D™ (Luminex® FLEXMAP3D®) para analisar até 100 ou 500 regiões de *beads*, respectivamente, em um único teste.

O ensaio misto (*MIXED*) detecta a presença de anticorpos para antígenos HLA de Classe I e/ou Classe II. Os testes PRA conseguem detectar os anticorpos e as suas especificidades contra os antígenos HLA presentes em cada painel LABScreen. O ensaio *Single Antigen* permite a confirmação da especificidade do anticorpo, sugerida por um teste PRA realizado previamente, enquanto as *beads* individuais são utilizadas para focalizar reações a um ou a alguns antígenos, pe.ex., para comparar a reatividade de diferentes amostras de soro do mesmo indivíduo. Utiliza-se um soro de controle negativo para estabelecer o valor de cada *bead* em um lote de teste.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O soro de teste é incubado com as *beads* LABScreen. Quaisquer anticorpos HLA presentes no soro de teste ligam-se aos antígenos nas *beads* e são posteriormente marcados com IgG anti soro de cabra conjugado com R-Ficoeritrina (PE). O(s) analisador(es) de fluxo LABScan™ 100 ou LABScan3D™ detecta(m) simultaneamente a emissão fluorescente de PE e a presença de corante em cada *bead*, permitindo uma aquisição de dados quase em tempo real. Para atribuir a especificidade PRA e HLA, o padrão de reação do soro de teste é comparado com a folha de trabalho específica do lote, que define o conjunto de antígenos.

4. COMPONENTES

| COMPONENTES | CONTEÚDO | QUANTIDADE |
|------------------|--|---|
| LS1PRA | Kit LABScreen® PRA Classe I - Detecção de anticorpos de Classe I e Especificidades | Mistura de Beads LABScreen® de classe I: 1 X 125 µL / Tampão de lavagem 10X: 1 X 13 mL |
| LS2PRA | Kit LABScreen® PRA Classe II - Detecção de anticorpos de Classe II e Especificidades | Mistura de Beads LABScreen® de classe II: 1 X 125 µL / Tampão de lavagem 10X: 1 X 13 mL |
| LSM12 | Kit LABScreen® Mixed Classe I e II - Detecção Simultânea de Ac. Classe I e II, incluindo o MICA. | Mistura de Beads LABScreen® Mixed: 1 X 500 µL / Tampão de Lavagem 10X: 1 X 52 mL |
| LS1A04 | Kit LABScreen® Single Antigen Classe I – Detec. de Ac. HLA de Classe I - Combi - Grupo 4 | Beads antígenos únicos de Classe I LABScreen®: 1 X 125µL / Tampão de lavagem 10X: 1 X 13 mL |
| LS2A01 | Kit LABScreen® Single Antigen de Classe II – Detec. de Ac. HLA de Classe II – Grupo 1 | Beads antígenos únicos de classe II LABScreen® - Grupo 1: 1 X 125 µL / Tampão de lavagem 10X: 1 X 13 mL |
| LS-AB2 | Conjugado PE de cabra, anti-humano IgG para uso em conjunto com kit LABScreen® | 1 X 1 mL (liofilizado) |
| LS-NC | Soro controle Negativo para uso em conjunto com kit LABScreen® | Soro controle Negativo – 1 x 400µL |
| LSMICA001 | Kit LABScreen® Single Antigen MICA – Grupo 1. Detec. de Ac. e Especificidades | Beads antígenos únicos MICA - Grupo 1: 1 X 125 µL / Tampão de lavagem 10X: 1 X 13 mL |
| LSMUTR | Kit LABScreen® Multi HLA Classe I e II e HNA | Mistura de beads de classe I e II e HNA LABScreen®: 1 X 500 µL / Tampão de Lavagem LABScreen®: 1 x 52 mL |

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Os produtos LABScreen devem ser transportados em gelo seco. O pacote completo deve ser conservado em câmara fria a -65°C ou temperatura inferior antes da primeira utilização, até a data de validade indicada na etiqueta.

Depois de as *beads* serem descongeladas, NÃO VOLTAR A CONGELAR. Conservar a uma temperatura de 2 a 8°C durante um máximo de três meses ou até a data de validade.

Após a primeira utilização, conservar o tampão de lavagem a uma temperatura de 2 a 8°C durante um máximo de três meses ou até a data de validade.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- IgG caprino anti-humano conjugado com PE (N°. Cat. OLI LS-AB2);
- PBS, filtrado [N°.Cat. USA Scientific 9242 (500 mL 10X) ou equivalente];
- Tubo de microcentrifuga de 1,5 mL (N°.Cat. USA Scientific 1415-2500 ou equivalente);
- Ponteiras (Rainin GPS);
- Soro de Controle Negativo, que não contenha anticorpos HLA quando testado pelo método LABScreen (N°.Cat. OLI LS-NC ou equivalente).

Se o teste for realizado numa microplaca de 96 poços:

- Microplaca de 96 poços, 250 µL, superfície não tratada (N°.Cat. Whatman 7701-3250 ou equivalente);
- Películas para selagem da placa (N°.Cat. OLI SSPSEA300 ou equivalente).

Para opção de placa de filtro:

- Placa de filtro (Multiscreen-BV, N°.Cat. OLI SSPSEA300 ou equivalente).

7. PRECAUÇÕES E AVISOS

- Os reagentes do teste LABScreen PRA contêm azida sódica a 0,1% (NaN₃) como conservante. Mediante condições ácidas, a azida sódica produz ácido hidrazóico, um composto extremamente tóxico. Diluir os reagentes que contêm azida sódica em água corrente antes de eliminar, para evitar o acúmulo na canalização e a criação de condições explosivas;
- Todos os produtos derivados do sangue devem ser tratados como potencialmente infecciosos. Constatou-se que o material de origem do qual deriva este produto é negativo quando testado em conformidade com os testes atualmente exigidos pela FDA. Nenhum

método de teste conhecido pode oferecer garantias de que os produtos derivados do sangue humano não transmitem agentes infecciosos;

- Para fazer um movimento súbito das placas manualmente, faça um movimento rápido para baixo com o braço, sem movimentar o pulso, para prevenir os efeitos de movimento repetitivo.

8. AMOSTRAS

- As amostras de sangue não abertas podem ser conservadas à temperatura ambiente por até quatro dias. O soro separado (amostras coaguladas) ou o plasma (em ACD ou K-EDTA) podem ser refrigerados por até sete dias, ou as alíquotas podem ser congeladas a uma temperatura de -20°C ou inferior e descongeladas imediatamente antes do ensaio. Os agregados devem ser removidos do soro/plasma de teste antes do teste por meio de centrifugação (de 8.000 a 10.000 g durante 10 minutos) ou filtração (0,2µm). A ocorrência de quaisquer agregados ou contaminação da amostra pode gerar resultados inválidos;
- O soro ou plasma de teste não deve ser inativado por calor, pois pode oferecer um fundo elevado no teste;
- Utiliza-se normalmente soro ou plasma não diluído para o teste. No entanto, se for diluída para este ensaio uma amostra de soro com alto background, o soro de controle negativo deve ser testado à mesma diluição.

9. PREPARO DOS COMPONENTES

- Dar atenção especial ao processo de elaboração de alíquotas. O não cumprimento dos passos que se descrevem abaixo poderá dar origem à perda de reagente;
- As Seções A a C, no item “11. Protocolo,” indicam os volumes de reagentes necessários para testar um único grupo de *beads*. Se for processar um teste combinado, ver a Seção D antes de continuar;
- Ligar o analisador de fluxo LABScan 100™ ou LABScan3D™ pelo menos 30 minutos antes de iniciar o ensaio;
- Criar uma ficha de códigos de nomes de arquivo e amostras para cada placa de teste;
- Se os sais do tampão forem precipitados para fora da solução durante o transporte ou o armazenamento, voltar a dissolver aquecendo suavemente antes de preparar a diluição de trabalho.

I. Para cada lote de teste, deve ser testado um soro de controle negativo (p.ex., N.º Cat. OLI LS-NC ou equivalente), para se estabelecer valores de fundo. Para completar o teste num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml

1. Misturar bem as *beads* LABScreen, homogeneizando suavemente no *vortex* ou pipetando para cima e para baixo várias vezes antes de utilizar;
2. Incubar no escuro, durante 30 minutos à temperatura de 20°C a 25°C, agitando suavemente, 5 µl de *beads* LABScreen com 20 µl de soro de teste em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml;
3. Diluir o tampão de lavagem 10X (N.º Cat. OLI LSPWABUF) em água destilada para obter uma solução 1X;
4. Acrescentar 1 ml de tampão de lavagem 1X a cada *bead*/tubo de soro e homogeneizar no *vortex*. Centrifugar a 9.300 x g durante 2 minutos. Aspirar e eliminar o sobrenadante;
5. Repetir a etapa 4 duas vezes;
6. Diluir 1 µl de IgG anti-humano conjugado com PE 100X por teste (N.º Cat. OLI LS-AB2) com 99 µl de tampão de lavagem 1X, para obter uma solução 1X;
7. Acrescentar 100 µl de IgG anti-humano conjugado com PE 1X a cada tubo. Submeter ao agitador *vortex* e incubar no escuro durante 30 minutos à temperatura de 20 a 25°C agitando suavemente;
8. Repetir a etapa 4 duas vezes;
9. Acrescentar 80 µl de PBS 1X a cada tubo. Proceder à aquisição e análise de dados ou armazenar a placa à temperatura de 2 a 8°C, no escuro, durante, no máximo, 24 horas antes da análise;

II. Para completar o teste numa placa de 96 poços

Aviso: Pressionar a película contra a margem de cada um dos 96 poços da placa para selá-los completa e cuidadosamente e evitar a contaminação das amostras entre os poços. Não voltar a utilizar as películas para selagem das placas. Utilizar uma película nova para cada passo que exija a aplicação de uma película para selagem de placas.

1. Misturar bem as *beads* LABScreen, homogeneizando suavemente no *vortex* ou pipetando para cima e para baixo várias vezes antes de utilizar;
2. Incubar no escuro, durante 30 minutos à temperatura de 20°C a 25°C, agitando suavemente, 5 µl de *beads* LABScreen com 20 µl de soro de teste em cada poço de uma placa de 96 poços;
3. Diluir tampão de lavagem 10X (N.º Cat. LSPWABUF) em água destilada para obter uma solução de lavagem 1X;
4. Após a incubação, acrescentar 150 µl de tampão de lavagem 1X a cada poço da placa. Selar a placa (N.º Cat. OLI SSPSEA300 ou equivalente) e submeter ao *vortex*. Centrifugar a 1.300 x g durante 5 minutos;
5. Remover o tampão de lavagem dos poços da placa com um movimento súbito ou por aspiração;
6. Acrescentar 200 µl de tampão de lavagem 1X a cada poço da placa. Cobrir com uma nova película de selagem de placas e submeter ao *vortex*. Centrifugar a 1.300 x g durante 5 minutos;
7. Remover o sobrenadante dos poços da placa com um movimento súbito ou por aspiração;

8. Repetir as etapas 6 e 7;
9. Diluir 1 µl de IgG anti-humano conjugado com PE 100X por teste (N.º Cat. OLI LS-AB2) com 99 µl de tampão de lavagem 1X, para obter uma solução 1X;
10. Acrescentar 100 µl de IgG anti-humano conjugado com PE 1X a cada poço. Cobrir com película de selagem de placas e submeter ao *vortex*. Incubar durante 30 minutos no escuro a uma temperatura entre 20°C e 25°C, agitando suavemente;
11. Centrifugar a 1.300 x g durante 5 minutos;
12. Remover o sobrenadante dos poços da placa com um movimento súbito ou por aspiração;
13. Repetir os passos 6 e 7 duas vezes;
14. Acrescentar 80 µl de PBS 1X a cada poço. Cobrir com uma nova película de selagem de placas e submeter ao *vortex*. Proceder à aquisição e análise de dados ou armazenar a placa à temperatura de 2 a 8°C, no escuro, durante, no máximo, 24 horas antes da análise;

III. Para completar o teste numa placa de filtro de 96 poços

1. Misturar bem as *beads* LABScreen, homogeneizando suavemente no *vortex* ou pipetando para cima e para baixo várias vezes antes de utilizar;
2. Diluir tampão de lavagem 10X (N.º Cat. OLI LSPWABUF) em água destilada para obter uma solução 1X (aproximadamente 3,2 ml/placa/lavagem);
3. Cobrir todos os poços da placa que não sejam utilizados durante o teste com uma película de selagem de placas, para assegurar que os poços não utilizados permanecem secos; Humedecer previamente os filtros da placa de filtros, distribuindo 300 µl de tampão de lavagem apenas nos poços que vão ser utilizados para o ensaio;
4. Incubar a placa durante 10 minutos numa plataforma de placa agitadora a baixa velocidade;
5. Aspirar todos os tampões de lavagem dos poços, utilizando um tubo de vácuo Millipore. Não exceder uma pressão de vácuo de 100 mm Hg!;
6. Acrescentar 5 µl de *beads* LABScreen e 20 µl de soro de teste a cada poço de teste.
Observação: Durante as etapas de distribuição das *beads* e das amostras, apertar suavemente a ponta da pipeta contra os poços da placa de filtro para evitar a ruptura do filtro;
7. Incubar a placa durante 30 minutos no escuro a uma temperatura entre 20°C e 25°C, agitando suavemente;
8. Acrescentar 175 µl de tampão de lavagem por poço;
9. Ligar a bomba de vácuo. Premir firmemente a placa no tubo de vácuo. Certificar-se que o líquido escoar devagar. Certificar-se de que todo o líquido foi drenado dos poços antes de prosseguir;
Aviso: Não exceder uma pressão de vácuo de 100 mm Hg! Uma aspiração rápida provoca a perda de *beads* por estas ficarem presas nos poros do papel de filtro.
10. Repetir as etapas 8 e 9, acima, quatro vezes;

11. Acrescentar 100 µl de IgG anti-humano conjugado com PE 1X a cada poço;
12. Incubar durante 30 minutos no escuro a uma temperatura entre 20°C e 25°C, agitando suavemente;
13. Repetir as etapas 8 e 9 cinco vezes;
14. Acrescentar 80 µl de PBS 1X a cada poço;
15. Ler a amostra no analisador de fluxo LABScan 100™ ou LABScan3D™, ajustando a altura da sonda, se necessário.

IV. Testes combinados

Qualquer um dos protocolos acima indicados pode ser usado num teste combinado para certos produtos LABScreen.

- Para ver as combinações aceitáveis de lotes de LS12PRA, consultar www.onelambda.com (Antibody Detection>LABScreen>LABScreen PRA/ *Product Documentation: LABScreen Bead Combo – Multiple IDs DataSheet*);
- Não combinar painéis de LABScreen Single Antigen Classe I Combi e Classe II (as IDs das *beads* coincidiriam).

1. Misturar volumes iguais de *beads*. Em seguida, dispensar a quantidade agregada correta (10 ou 15 µl) da mistura de *beads* por teste;
2. As combinações de *beads* e as quantidades a serem dispensadas estão relacionadas no quadro abaixo.

| ID Catálogo | Volume de <i>beads</i> por teste | <i>Beads</i> de Controle (CN/CP) | Soro de teste por teste |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| LS12PRA (<i>beads</i> CI e CII) | 5 µL + 5 µL | Incluídas | 40 µL |
| LS1A04 | 5 µL | Incluídas | 20 µL |

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS EM CONJUNTO COM O PRODUTO

- Analisador de fluxo LABScan™ 100 (Luminex®100/200) com a plataforma Luminex®XY (para a aquisição de dados automáticos de 96 amostras) e um sistema de fornecimento de fluido de proteção (Nº.Cat. OLI LABSCNXS2) ou analisador de fluxo LABScan3D™ (Luminex® FLEXMAP3D®) com plataforma XY e sistema de fornecimento de fluido de proteção (Nº.Cat. OLI LABSCNXS4);
- Centrífuga;
- Rotor para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (9.300 x g) ou um rotor do tipo cesto de oscilação para microplaca de 96 poços (1.300 x g);
- Misturador tipo *Vortex*;

- Placa agitadora ou plataforma de rotação.

Para opção de placa de filtro:

- Tubo de vácuo, 96 poços (N°.Cat. Milipore MAVM0960R ou equivalente);
- Bomba de vácuo com uma pressão de menos de 100 mm Hg;
- Placa agitadora ou plataforma de rotação.

11. PROTOCOLO**A. Aquisição de dados**

1. Configurar o analisador de fluxo LABScan 100™ ou LABScan3D™ para aquisição e calibração de amostras, de acordo com o Manual do Utilizador do Luminex.
2. Escolher um modelo (*template*) de acordo com a ID e o número de lote indicados no catálogo do produto.
 - a) Os modelos de aquisição estão disponíveis na OLI em CD ou podem ser descarregado do nosso site.
 - b) Para criar o seu próprio modelo de aquisição, seguir as instruções no capítulo Aquisição do Manual do Utilizador do Luminex.
 - c) Versões do software Luminex compatíveis com o LABScan 100 (IS 2.3or xPONENT 3.1) e com o LABScan 3D (xPONENT 4.0 ou xPONENT 4.2).
3. Criar um nome de pasta para as amostras que vão ser analisadas.
4. Certificar-se de que as definições do modelo estão corretas. As especificações do modelo são:
 - a) Configurar o volume das amostras como 50 µl.
 - b) Configurar o tempo de análise das amostras como 80 segundos.
 - c) Configurar a porta selecionadora dupla (*doublet discriminator gate*) para 8.000 (limite inferior) e 16.000 (limite superior).
 - d) Configurar a quantidade e ID das *beads* selecionado de acordo com a folha de trabalho específica do produto, fornecida com o mesmo.
 - e) Configurar os eventos mínimos recolhidos para 100 por *bead*.
 5. Inserir as IDs das amostras (se a mesma amostra for testada mais de uma vez, atribuir uma ID diferente).
 6. Colocar a placa na plataforma XY e encher o reservatório com fluído de proteção.
 7. Premir o botão START para iniciar a sessão. Após a análise das amostras, guardar os dados obtidos em uma pasta.csv.
 8. No final da sessão, lavar a máquina 2 vezes com fluído de proteção.

B. Análise de Dados

1. A reatividade de uma amostra de teste é calculada com base nos valores “brutos” de fluorescência registados pelo aparelho LABScan (ficheiro .csv) para cada *bead* revestida com HLA;
2. Calcular a reatividade sérica anti-HLA corrigindo para ligação não específica à *bead* de controle negativo e valores de background (obtidos por meio de testes com um soro de controle negativo (N.º Cat. OLI LS-NC) para calcular o *Ratio* de fundo normalizado (Ratio NBG). Ver os cálculos indicados abaixo;
3. Relativamente ao LABScreen PRA ou ao *LABScreen Single Antigen*, o valor fluorescente normalizado para cada *bead* revestida com HLA é igual ao valor da *bead* dividido pelo valor da *bead* de controle negativo (CN). (No caso do LABScreen *Mixed*, o sinal fluorescente normalizado é equivalente ao valor da *bead* revestida Classe I ou Classe II menos o valor da *bead* de controle negativo).

C. Observação: O sinal (valor) fluorescente pode ser o valor médio ou mediano ajustado. Cálculos

1. As abreviações usadas nesta seção são definidas abaixo:

Razão NBG: Ratio de fundo normalizado usado para atribuir a potência de cada reação anti-HLA

S#N: Valor da fluorescência específica da amostra para a *bead* #N

Bead SNC: Valor da fluorescência média específica da amostra para a *bead* de controle negativo

BG#N: Valor da fluorescência do soro CN de fundo para a *bead* #N

BEAD/BGNC: Valor da fluorescência do soro CN de fundo para a *bead* de controle negativo

Soro NC Soro de Controle Negativo (N.º Cat. OLI LS-NC) validado para um determinado lote de *beads* LABScreen

2. Para LABScreen® PRA ou Antígeno Simples LABScreen®:

$$\text{NBG Ratio} = \frac{\text{S\#N} / \text{SNC Bead}}{\text{BG\#N} / \text{BGNC Bead}}$$

3. Para LABScreen® Mixed:

$$\text{NBG Ratio} = \frac{\text{S\#N} - \text{SNC Bead}}{\text{BG\#N} - \text{BGNC Bead}}$$

Obs.: Se (BG#N-BGNC *bead*) for menor que 50, o valor padrão predefinido utilizado é 50.

D. Determinação do valor de corte positivo/negativo

1. Para LABScreen PRA e LABScreen Mixed:

- a. Selecionar o ratio NBG que apresenta um desvio significativo em relação ao valor fluorescente de fundo quando o valor de fundo é obtido usando um soro de controle negativo em 3 a 5 testes de replicados. Se preferir, teste 5 a 10 amostras de soro recolhidas de indivíduos do sexo masculino que nunca receberam transfusões ou transplantes, para obter uma média do valor de fundo.
- b. Validar o valor de corte usando 5 a 10 amostras de um alo-soro de referência com a especificidade do anticorpo HLA definida. A *razão* dos valores de NBG relativamente às reações esperadas para o antígeno positivo deve estar acima do valor de corte.
- c. Podem ser observadas reações positivas/negativas acrescenciais. Se necessário, ajustar o valor de corte do ensaio LABScreen para corresponder à sensibilidade de um ensaio de detecção de anticorpo previamente aceite.
- d. Para soros com PRA elevado, o(s) antígeno(s) do próprio paciente poderão apresentar reações positivas fracas. Nestes casos, o valor de fluorescência para o antígeno do próprio paciente poderá ser usado como valor de corte.

2. Para o LABScreen Single Antigen:

- a. Testar o controle negativo ou várias amostras de soro negativas (ver item 1 acima).
- b. Definir o intervalo de trabalho:
Intervalo de Trabalho = *Razão* NBG máximo - *razão* NBG mínimo
- c. Definir os valores de corte dentro do intervalo de trabalho:
Valor de corte do *Razão* NBG relativo = X% (intervalo de trabalho) + *razão* NBG mínimo, em que X% = valor de corte percentual definido pelo utilizador dentro do intervalo de trabalho para negativo (1), área cinzenta (2), positivo fraco (4) e positivo forte (8).
- d. Estabelecer os critérios para definir, por exemplo, as reações positivas vs. as reações negativas:
 - (1) Se [*Razão* NBG máx/*Razão* NBG mín] >8, aplicar o cálculo descrito em 2c.
 - (2) Se [*Razão* NBG máx / *Razão* NBG mín] <8 E
 - (a) *Ratio* NBG máx >5, então a *razão* NBG mín deve ser ajustado para metade da *razão* NBG máx e o valor de corte da *razão* NBG relativo deve ser calculado novamente (como em 2c) , com base no ajuste do *razão* NBG mín. A reação é, então, pontuada como mencionado acima.
 - (b) *Razão* NBG máx <5, então a reação do soro de teste com aquela *bead* é negativa. Atribuir uma pontuação de "1".
- e. Testar vários soros de referência como indicado em 1b, usando a *razão* NBG relativo para validar o valor de corte.
 - (1) Estabelecer um valor de corte correspondente a reatividade forte e fraca, com base no

desempenho dos soros de referência relativos a um determinado ensaio.

(2) Poderá ser útil traçar os valores *razão* NBG num histograma, para visualização do padrão de reatividade do HLA em cada soro.

3. Sensibilidades mais elevadas ou mais baixas podem ser obtidas ajustando-se o valor de corte.
4. Análise opcional – software HLA Fusion™.

Valores Esperados

A. LABScreen PRA Classe I ou Classe II

- A reatividade de um soro de teste em relação a cada uma das *beads* pode ser comparada, para se distinguir as reações positivas fortes, positivas fracas e negativas. Os *resultados* da reatividade podem ser classificados dentro de intervalos diferentes, caso se pretenda um sistema de pontuações.
- Os nossos dados apresentam *razão* NBG > 1,5 no teste LABScreen PRA (utilizando o LABScan™ 100) que demonstram correlacionar-se muito bem com as reações positivas obtidas no teste FlowPRA.
- Para calcular a percentagem de PRA (anticorpo reativo do painel), dividir o número de reações positivas pelo número de reações válidas para esse soro de teste.
- Para determinar a especificidade do anticorpo HLA, introduzir a pontuação da reação na folha de dados específica do lote e analisar o padrão de reação.

B. LABScreen *Mixed*

- Atribuir pontuações às reações HLA de Classe I e Classe II separadamente, de acordo com o índice de reatividade do soro para cada conjunto de *beads*.
- Se qualquer uma das *beads* no ensaio misto for positiva, o resultado deverá ser classificado como positivo.
- Os nossos dados apresentam *razão* NBG > 2,2 no teste LABScreen *Mixed* (utilizando o LABScan™ 100) que demonstram correlacionar-se muito bem com as reações positivas obtidas no teste LAT™ *Mixed*.

C. LABScreen *Single Antigen*

- Os soros podem produzir *razão* de sinal/background muito mais elevados que os obtidos no ensaio PRA.
- Estabelecer o valor de corte do ensaio usando a *razão* NBG relativa é uma forma de normalizar os dados (ver Resultados, Seção D-2c).

- Os nossos dados mostram que um valor de corte positivo/negativo ou uma razão NBG relativa > 15% da razão NBG do intervalo de trabalho, calculado para cada soro de teste (utilizando o LABScan™ 100), fornecerá resultados comparáveis ao ensaio LABScreen PRA.

D. Diretrizes gerais

- Cada contagem de *beads* deve ser acima de 50. Uma contagem mais baixa pode significar à perda de amostra durante as etapas de lavagem. Também poderá ser por causa de uma calibração inadequada ou bloqueio do analisador de fluxo LABScan™ 100 ou LABScan3D™ ou por *beads* fotobranqueadas que saíram da região mapeada.
- Os valores dos sinais representam a intensidade de fluorescência de cada conjunto de *beads* em comparação com o soro de teste. Deve ser testado um soro de controle negativo com o mesmo lote de amostras, para se estabelecer o(s) valor(es) de fundo para esse teste.
- Soro de Controle Negativo (N.º Cat. OLI LS-NC ou equivalente) é recomendado. A utilização de qualquer outro soro de controle negativo requer o ajuste dos valores de corte.
- As *beads* de controle negativo (Ag ID = CN) não são revestidas com antígeno HLA. O valor de fluorescência pode variar entre os diferentes soros devido à ligação não específica dos soros ou a lavagem insuficiente. O valor de CN é normalmente inferior a 500, exceto para as amostras de soro com um valor de alto background. Este deve ser sempre inferior a 1.500 e menor ou igual à metade do valor do controle positivo (CP).
- As *beads* de Controle Positivo são revestidas com IgG humano purificado, que deverão ligar-se ao anticorpo secundário para produzir um sinal positivo. O valor do CP deve ser superior a 500 e pelo menos duas vezes o valor do CN.

E. Validação do Ensaio

- O valor de corte dos sinais de background deve ser validado se for usado um novo soro de controle negativo.
- Para um determinado soro, o valor CP/CN deve ser superior a 2. Um valor mais baixo pode ser resultado de um valor de fundo extremamente elevado das *beads* de controle negativo para o soro de teste, de um sinal elevado das *beads* HLA para o controle NS, ou de um sinal baixo do anticorpo secundário ou do analisador de fluxo LABScan™ 100 e LABScan3D™. Neste caso, os dados poderão ter de ser confirmados.
- Cada usuário deve avaliar o desempenho do ensaio no seu laboratório, para validar o(s) valor(es) de corte selecionado(s).
- As amostras de plasma podem produzir FI mais baixo ou valores de background mais altos do que as de soro. O utilizador pode querer normalizar os dados ao comparar os resultados entre

as amostras de soro e plasma (ver a Referência 5) para os mesmos ou diferentes participantes do teste.

12. CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se que a cada novo lote seja realizado testes com o uso de soros com anticorpos cuja reatividade seja previamente conhecida, a fim de avaliar a correta caracterização dos anticorpos, bem como a porcentagem do painel de anticorpo (PRA)

13. DESEMPENHO, INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

- Utilizando os valores de corte do ensaio referenciados em Valores Esperados, acima, os ensaios LABScreen forneceram resultado comparáveis aos resultados dos ensaios One Lambda, One Lambda FlowPRA® e LAT™. No entanto, os padrões do anticorpo HLA podem ser bastante complexos. Uma determinada amostra de teste pode conter várias especificidades dos anticorpos HLA de Classe I e Classe II, cada uma com uma avidéz diferente; contudo, nem todas as especificidades são reconhecidas em ensaios com uma menor sensibilidade. Deste modo, cada laboratório deve estabelecer e validar, para uso próprio, os valores de corte do ensaio, com base na sua experiência em reconhecer os padrões HLA CREG e na avaliação do desempenho do ensaio usando soros HLA com especificidades definidas.
- A comparação de soro e plasma para 1 000 doadores de sangue no estudo NIH/NIH REDS-II (5) demonstrou uma boa correlação dentro do intervalo de trabalho do ensaio. Para os anticorpos anti-HLA CI e CII, os valores R2 foram de 0,88 e 0,91 respectivamente. Contudo, a razão NBG em geral foi 1,3 vezes maior do que o das amostras de soro.
- Um background elevado pode ser indicação de lavagem inadequada durante o protocolo do teste. Um background de controle negativo elevado pode causar valores normalizados de MFI incorretos.
- Os produtos LABScreen foram submetidos a testes de desempenho clínico em três clínicas diferentes utilizando 240 amostras aleatórias – consultar o Quadro A. Desempenho clínico;
- Os produtos LABScreen foram submetidos a testes de reprodutibilidade clínica em três clínicas diferentes utilizando 16 (LS1PRA, LS2PRA, LS1A04) e 32 (LSM12) amostras, consistindo em 10 análises cada, em triplicado – consultar o Quadro B. Reprodutibilidade clínica.
- Os testes clínicos utilizaram um valor de corte predefinido, com pontuações >4 consideradas positivas.
- As amostras de soro ou plasma que contêm contaminantes ou agregados podem bloquear o analisador de fluxo LABScan 100 e gerar dados imprecisos. Os agregados presentes na amostra de teste devem ser removidos por centrifugação ou filtragem do soro antes da realização do teste.

- A temperatura ambiente pode afetar o desempenho do LABScan 100™ e LABScan3D™. Caso a temperatura ambiente seja alterada, o equipamento pode necessitar de calibração novamente. Consultar o manual do fabricante para obter mais informações.
- A calibração e manutenção do analisador de fluxo LABScan 100™ e LABScan3D™ tem de ser feita de forma adequada. No caso de lavagem insuficiente do sistema, os agregados da amostra podem causar bloqueios na máquina, gerando dados inválidos.
- A atribuição da especificidade do anticorpo é limitada aos antígenos HLA presentes em cada um dos painéis de *beads*.
- A região de *beads* usada para cada antígeno e a composição de antígenos do painel pode variar de lote para lote do produto.
- Devido à complexidade das definições alélicas do HLA, um técnico ou especialista de HLA certificado deve rever e interpretar os dados e atribuir a tipagem HLA.
- Este teste não deve ser usado como única base para tomar uma decisão clínica.

| Quadro A – Desempenho clínico | | | | |
|--|--|----------------------|----------------|--|
| LSM12 | | LABScan 3D | | |
| | | + | | |
| | | - | | |
| LABScan 100 | | + | 573 | 11 |
| | | - | 4 | 119 |
| | | Desconhecidos 40 | | |
| | | Total conhecidos 707 | | |
| | | Conc. positiva | Conc. negativa | Conc. geral (excluindo-se desconhecidos) |
| Estim. pontual | | 98% | 97% | 98% |
| Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | | 97% | 93% | 97% |
| LS2PRA | | LABScan 3D | | |
| | | + | | |
| | | - | | |
| LABScan 100 | | + | 939 | 57 |
| | | - | 187 | 7781 |
| | | Total 8964 | | |
| | | Conc. positiva | Conc. negativa | Conc. geral |
| Estim. pontual | | 94% | 98% | 97% |
| Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | | 93% | 97% | 97% |
| LS1PRA | | LABScan 3D | | |
| | | + | | |
| | | - | | |
| LABScan 100 | | + | 2060 | 260 |
| | | - | 446 | 16905 |
| | | Total 19671 | | |
| | | Conc. positiva | Conc. negativa | Conc. geral |
| Estim. pontual | | 89% | 97% | 96% |
| Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | | 88% | 96% | 96% |
| LS1A04 | | LABScan 3D | | |
| | | + | | |
| | | - | | |
| LABScan 100 | | + | 3245 | 214 |
| | | - | 682 | 12062 |
| | | Total 16203 | | |
| | | Conc. positiva | Conc. negativa | Conc. geral |
| Estim. pontual | | 94% | 95% | 94% |
| Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | | 93% | 94% | 94% |

| Quadro B – Reprodutibilidade clínica | | | | | | | | |
|--|--|--|--|-------------|--|-------------|--|-------------|
| LSM12 | Conc. geral (excluindo-se desconhecidos) | Conc. geral (incluindo-se desconhecidos) | LS1PRA | Conc. geral | LS2PRA | Conc. geral | LS1A04 | Conc. geral |
| Estim. pontual | 98% | 93% | Estim. pontual | 99% | Estim. pontual | 99% | Estim. pontual | 98% |
| Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | 97% | 93% | Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | 99% | Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | 99% | Limiar unilateral inferior de confiança de 86% | 98% |

14. GARANTIA

A **Biometrix Diagnóstica LTDA** situada na Rua Estrada da Graciosa, 1.081 CEP: 82840-360, Curitiba, Paraná, fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

Garantia

O produto **LABSCREEN** é garantido pela Biometrix contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

Exceções na garantia:

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

Extinção da garantia:

Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA LTDA.

Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360

Tel.: (41) 2108-5250 Fax: (41) 2108-5252 DDG: 0800-7260504

E-mail: biometrix@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

21001 Kittridge Street

Canoga Park - CA - EUA

REGISTRO ANVISA

80298490004

RESPONSÁVEL TÉCNICA

FLAVIA STIVAL

CRF/PR: 26565

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

| REVISÃO | DATA | DESCRIÇÃO |
|---------|---------|--|
| 00 | 11/2006 | Elaboração |
| 01 | 02/2011 | Formatação, layout, produtos descontinuados, alteração nas condições de armazenagem e transporte, inclusão das denominações comerciais de cada item da família, inclusão de número de registro e alteração de Responsável Técnica. |
| 02 | 02/2011 | Alteração na apresentação comercial da família. |
| 03 | 09/2012 | Alteração do DDG. |
| 04 | 12/2012 | Revisão gramatical e ortográfica, formatação, alteração de Responsável Técnica. |
| 05 | 11/2015 | Alteração de Responsável Técnica. Atualizações das informações conforme ultima versão do documento do fabricante. |