

FlowDSA-XM™

REF Catálogo: FLDSA

Apenas para uso em pesquisa. Não indicado para uso em procedimentos diagnósticos.

REAGENTES

A. Identificação

- O FlowDSA-XM utiliza um painel de micropartículas revestidas com anticorpos anti-HLA Classe I e II.



B. Advertências/ Precauções:

1. Somente para uso em pesquisa
2. **Aviso:** Os reagentes do teste FlowDSA-XM contêm 0,02% de azida sódica (NaN₃) como conservante. Sob condições ácidas, a azida sódica produz ácido hidrazóico, um composto extremamente tóxico. Reagentes contendo azida sódica devem ser diluídos em água corrente antes de ser descartados. Estas condições são recomendadas para evitar depósitos no encanamento, onde condições explosivas podem se desenvolver. (Consulte a FISPQ para mais detalhes).
3. **Aviso:** Todos os produtos derivados do sangue devem ser tratados como potencialmente infecciosos. O material de origem do qual este produto foi derivado foi considerado negativo quando testado de acordo com os testes atuais exigidos pela FDA. Nenhum método de teste conhecido pode garantir que produtos derivados de sangue humano não transmitam agentes infecciosos.
4. **Cuidado:** Para a "flicagem" manual das placas, realizar um rápido movimento do braço de cima para baixo, sem mexer o pulso, para evitar efeitos de movimento repetitivos.
5. Consulte a FISPQ para informações detalhadas.

C. Preparando Reagentes para Uso

1. Veja instruções de uso abaixo.



D. Instruções de Armazenamento

1. O kit inteiro pode ser armazenado em um freezer a -65°C ou abaixo até o primeiro uso, até a data de validade indicada.
2. Instruções de Armazenagem para o tampão de lavagem 1 (WB-1):
 - a) Uma vez que o tampão de lavagem 1 tenha sido descongelado, o reagente pode ser recongelado a -65°C ou abaixo por até 12 meses (ou até seu vencimento, caso aconteça antes desse período).
 - WB-1 precisa ser recongelado dentro de uma hora do descongelamento;
 - WB-1 pode ser aliquotado em frasco de polipropileno antes do recongelamento;
 - WB-1 pode ser recongelado somente uma vez. Caso o WB-1 seja descongelado novamente depois de um recongelamento, o reagente pode ser usado para teste e o volume remanescente deve ser descartado.
 - b) Caso o WB-1 não seja recongelado, o reagente pode ser armazenado a 2-8°C por até 4 semanas (ou até seu vencimento, caso aconteça antes desse período).



3. Instruções de Armazenagem para beads de captura, corante / tampão de lise, tampão de lavagem 2, e tampão de lavagem 3:
 - a) Uma vez que esses reagentes foram descongelados, **NÃO OS RECONGELE**. Devem ser armazenados de 2-8°C por até 12 meses (ou até seu vencimento, caso aconteça antes desse período).
 4. Beads de captura, corante / tampão de lise são sensíveis à luz e devem ser armazenados no escuro.
- E. Purificação ou Tratamento Necessário para Uso
Veja instruções de uso abaixo.
- F. Indicações de Instabilidade
Nenhuma

EQUIPAMENTOS REQUERIDOS

A. Equipamento Requerido

- Citômetro de Fluxo
- Centrífuga
- Rotor basculante para microplaca de 96 poços (2000 g)
- Agitador Vortex
- Agitador de placas ou plataforma rotativa
- Contador de célula
- Banho-maria a 37° C

B. Calibração de Equipamentos

Siga as instruções do fabricante para a calibração do citômetro de fluxo.

C. Software recomendado

Não aplicável.

COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

- A. Amostras de sangue não abertas podem ser mantidas à temperatura ambiente por até 4 dias. Soro separado (de amostras coaguladas) pode ser resfriado por até 7 dias. Alíquotas de soro podem ser congeladas de -20 a -80° C por até 3 anos e ser descongeladas pouco antes do ensaio. No entanto, os precipitados devem ser removidos do soro de teste por centrifugação (8.000 - 10.000 g por 10 minutos) ou filtração (0.2 µm) antes do teste. Quaisquer precipitados ou contaminação da amostra podem gerar resultados inválidos.
- B. O soro de teste não deve ser inativado por calor.
- C. O soro não-diluído é utilizado para o teste.

PROCEDIMENTO

A. Materiais Fornecidos

| Identificação Catálogo | Nome do Produto | Componentes do Produto |
|------------------------|-----------------|---|
| FLDSA | FlowDSA-XM | <ul style="list-style-type: none"> • FlowDSA-XM <i>Beads de captura</i> • FlowDSA-XM <i>Tampão de lise/corante</i> • FlowDSA-XM <i>Tampão de lavagem 1</i> • FlowDSA-XM <i>Tampão de lavagem 2</i> • FlowDSA-XM <i>Tampão de lavagem 3</i> |

B. Materiais necessários, mas não fornecidos.

1. Ponteiras
2. Microplaca de 96 poços (*Fisher Scientific cat.0720095; Corning 96 Well Clear Round Bottom TC-Treated Microplate Individually Wrapped, with Lid, Sterile Product #3799*)
3. Selo para placa (OLI Cat. # SSPSEA300 ou equivalente)

C. Instruções de Uso

Notas:

- Para métodos de isolamento de linfócitos, consultar o Manual de Laboratório ASH1¹.
 - Para alcançar a pureza de linfócitos necessária (> 90%) e eliminar ao máximo a contaminação por monócitos e / ou granulócitos, um procedimento de depleção deve ser realizado.
 - Tomar especial cuidado no processo de fracionamento. Não seguir os passos descritos abaixo pode resultar em perda de reagente.
 - A menos que seja especificado de outra forma, todas as etapas são realizadas à temperatura ambiente.
 - Manter todos os soros, frascos de beads de captura (*Capture Beads*), frascos de tampão de lise/corante (*Lysis/Stain Buffer*), tampões de lavagem (*Wash Buffer*) 1 e 3 no gelo. Manter o tampão de lavagem (*Wash Buffer*) 2 em temperatura ambiente.
 - Para Aquisição de Dados (Seção de Resultados A), testar em replicatas um soro de controle negativo e um soro de controle positivo de Classe I para Ajuste de Tensão e Compensação de Fluorescência. Isso só precisa ser executado ao configurar o teste pela primeira vez ou ao modificar uma configuração existente.
1. Agitar no vortex os linfócitos e distribuir $0,2 \times 10^6$ (menos de 250 µl em volume) em todos os poços pré-selecionados de uma placa de 96 poços.
 2. Selar e centrifugar a placa por 3 minutos a 1360 g.
 3. Remover o sobrenadante dos poços da placa por flicagem. Dar leves batidas em papel toalha antes de virar a placa. Selar e passar no vortex por 30 segundos.
 4. Adicionar 50 µl de soro em cada poço. Não misturar com a pipeta.
 5. Selar a placa e agitar no vortex durante 30 segundos.
 6. Incubar por 20 minutos a 20-25 °C, com agitação.
 7. Dispensar 150 µl de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) 1 (WB-1), o qual deve estar gelado/frio, em cada poço contendo amostra. Misturar por pipetagem 4-5 vezes para ficar homogêneo.
 8. Selar e centrifugar a placa por 3 minutos a 1360 g.
 9. Remover o sobrenadante dos poços da placa por flicagem. Dar leves batidas em papel toalha antes de virar a placa. Selar e passar no vortex por 30 segundos.
 10. Repetir os passos 7 – 9, totalizando duas lavagens.
 11. Antes de usar, misturar durante 10 segundos o frasco de beads de captura (*Capture Beads*) no vórtex.
 12. Adicionar 5 µl de beads de captura a cada poço contendo amostra. Não misturar com a pipeta. Selar a placa e agitar no vortex durante 30 segundos.
 13. Adicionar 150 µl de WB-1 frio a cada poço contendo amostra. Misturar por pipetagem 4-5 vezes.
 14. Selar e centrifugar a placa por 3 minutos a **2.000 g**.
 15. Remover o sobrenadante dos poços da placa por flicagem. Dar leves batidas em papel toalha antes de virar a placa. Selar e passar no vortex por 30 segundos.
 16. Misturar suavemente o frasco de Tampão de lise/corante (*Lysis/Stain Buffer*)(LSB) pipetando para cima e para baixo 4-5 vezes antes de usar. **Não passar no vortex.**
 17. Adicionar 25 µl de LSB a cada poço do teste. Não misturar por pipetagem. Selar a placa e agitar no vortex

durante 30 segundos.

18. Incubar no escuro por 30 minutos a 20-25 °C, com agitação.
19. Adicionar 150 µl de WB-1 frio para cada poço do teste. Misturar por pipetagem 4-5 vezes.
20. Selar e centrifugar a placa por 3 minutos a **2.000 g**.
21. Remover o sobrenadante dos poços da placa por flicagem. Dar leves batidas em papel toalha antes de virar a placa. Selar e passar no vortex por 30 segundos.
22. Adicionar **200 µl** de **Wash Buffer 2 (WB-2)** a cada poço do teste. Misturar por pipetagem 4-5 vezes.
23. Selar e centrifugar a placa por 3 minutos a **2.000 g**.
24. Remover o sobrenadante dos poços da placa por flicagem. Dar leves batidas em papel toalha antes de virar a placa. Selar e passar no vortex por 30 segundos.
25. Adicione **200 µl** de tampão de lavagem (**Wash Buffer**) (**WB-3**) a cada poço do teste. Misturar por pipetagem 4-5 vezes enquanto adiciona para misturar.
26. A amostra está pronta para análise no citômetro de fluxo. Armazenar a 2 - 5° C até o momento da leitura.

RESULTADOS

A. Aquisição de Dados

Notas:

- Todas as configurações de compensação devem ser definidas como 0. Elas não devem ser vinculadas a nenhum outro valor, pois a compensação deve ser realizada de forma independente para este teste. Isso só precisa ser executado ao configurar o teste pela primeira vez ou ao modificar uma configuração existente.
1. Seguir o procedimento diário de inicialização recomendado pelo fabricante do citômetro de fluxo para o alinhamento e controle de qualidade do equipamento.
 2. Configuração do Equipamento
 - a. Rodar um teste de controle usando 5 µl de beads de captura (*Capture Beads*) em 200 µl de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) 3 (WB-3) para configurar os ganhos FSC e SSC para localizar a população de beads no citômetro de fluxo (Figura 1).

Nota: Como as beads são menores que os linfócitos regulares, maiores ganhos de FSC podem ser esperados para visualizar as beads.

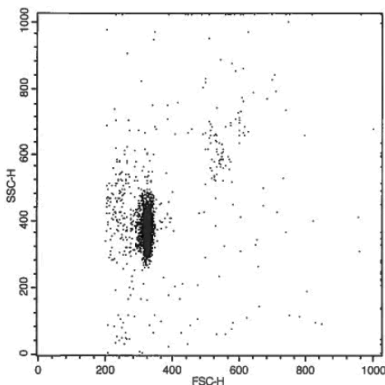


Figura 1. Exemplo de localização das beads FSC x SSC

b. Ajuste de Voltagem

- (1) Executar um teste FlowDSA-XM com um soro controle negativo e um soro controle positivo de Classe I.

- (2) Ajuste as voltagens FL2 e FL3 para colocar a população de beads negativos HLA-I no quadrante inferior esquerdo do gráfico FL2 x FL3 (Figura 2).

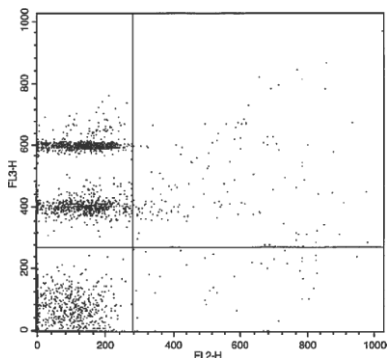


Figura 2. Exemplo de gráfico de pontos (dot-plot) FL2 x. FL3

c. Compensação de Fluorescência

- (1) Utilizando o soro controle negativo, ajustar FL2-% FL3 de modo que as beads HLA-IIb estejam alinhadas ao longo do eixo FL2 com as beads HLA-I (Figura 2).
- (2) Usando o soro controle positivo de Classe I, ajustar FL3-% FL2 de forma que os beads de HLA-I fiquem alinhados ao longo do eixo FL3 com a população controle negativo de Classe I (Figura 3 - Gráfico à direita).

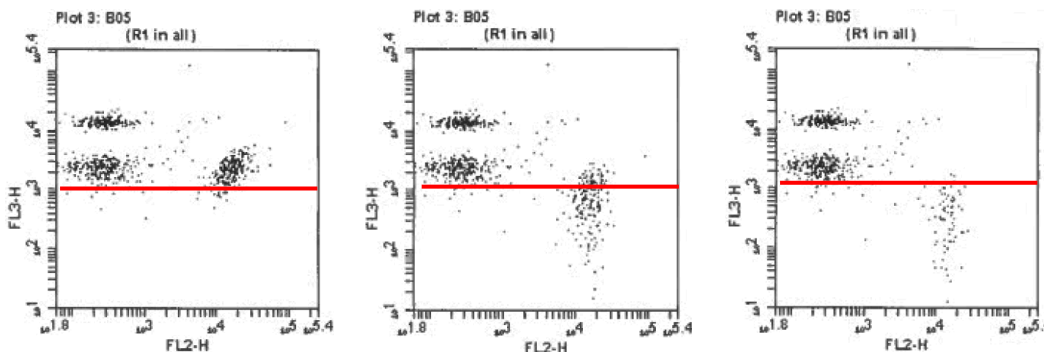


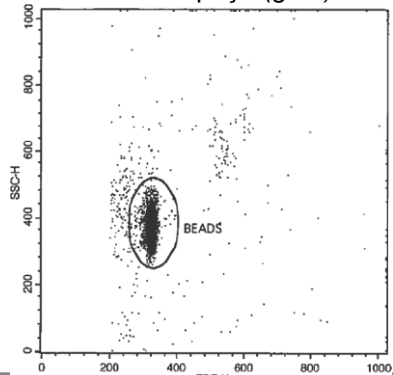
Figura 3. Exemplo de compensação FL2 x FL3. Os gráficos à esquerda e ao centro são exemplos de compensação insatisfatória. O gráfico à direita é um exemplo de compensação correta.

3. Aquisição das amostras

- a. Realizar a aquisição das amostras usando configurações de Ajuste de Voltagem e Compensação de Fluorescência.
- b. Adquirir 1000 - 5000 eventos para cada amostra.

B. Análise de Dados

1. Colocar no poço (*gate*) a maior população de beads de captura (*Capture Beads*) na plotagem FSC x SSC



(Figura 4).

Figure 4. Exemplo de poço (gate) FSC x. SSC

2. Gerar a plotagem FSC x FL3 do poço na região R1 (BEADS). Se disponível, o FL4 também pode ser usado no lugar do FL3. R2 (CI) é o poço para as beads de HLA-I; R3 (CIIa) é o poço para beads HLA-IIa; e R4 (CIIb) é o poço para beads de HLA-IIb (Figura 5). Gerar histogramas FL2 de cada amostra nos poços das regiões R1 e R2 para análise de Classe I, nos poços das regiões R1 e R3 para a análise de Classe IIa e regiões R1 e R4 para análise de Classe IIb.

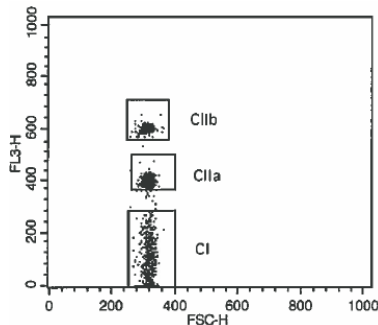


Figure 5. Exemplo de poços das Beads de captura FSC x FL3

3. As abreviaturas usadas nesta seção são definidas abaixo.

| | |
|-----|--|
| MCS | <i>Median Channel Shift</i> (Mediana do Desvio de Canal) |
| MCV | <i>Median Channel Value</i> (Mediana do Valor de Canal) |

4. Determinar o MCS para soros e controles positivos.

Cálculo do MCS:

$$\text{MCS} = \text{MCV do soro (ou controles positivos)} - \text{MCV dos controles negativos}$$

5. Arquivar os resultados.

C. Determinação do *cut-off* positivo / negativo

1. O método sugerido para determinar os valores de ponto de corte (*cutoff*) é descrito aqui. Os *cutoffs* para o kit FlowDSA-XM são determinados pelos resultados de 20 soros masculinos AB pré-testados contra 5 células alvo diferentes. São calculados o MCS para cada soro AB testado. As médias e desvios-padrão (SD) dos MCSs são calculados a partir de todos os MCSs obtidos. Os *cutoffs* sugeridos são a média mais 3SD.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- As amostras de soro que contêm contaminantes ou precipitados podem entupir o citômetro de fluxo e gerar dados imprecisos. Os precipitados na amostra devem ser removidos por centrifugação antes do teste.
- A aquisição precisa de dados depende do desempenho adequado do citômetro de fluxo. A máquina deve estar com as devidas manutenções e calibrações em dia.
- A determinação da especificidade é limitada aos anticorpos anti-HLA Classe I e Classe II presentes em cada *Capture Bead* (consultar *worksheet* específica do lote).
- Os anticorpos usados em cada bead de daptura (*Capture Bead*) anti-HLA Classe I e Classe II podem mudar de lote para lote de produto (consultar *worksheet* específica do lote).

ou tratamento de doenças ou para auxiliar no processo de tomada de decisão clínica. Este produto não é liberado ou aprovado para uso clínico pelo FDA ou aprovado na UE como um ensaio de diagnóstico in vitro, nem é marcado pela marca CE.

REPRESENTANTE BRASILEIRO AUTORIZADO

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: suporte@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

22801 Roscoe Blvd

West Hills – CA – EUA

REGISTRO ANVISA

Não passível de regulamentação.

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Giuliana Reis Clementi Pacheco

CRBio: 83.440/07-D







BIBLIOGRAFIA

1. ASHI Laboratory Manual, 3rd Edition, ASHI, Lenexa, KS.

MARCAS E ISENÇÕES DE RESPONSABILIDADE

FlowDSA-XM™

EXPLICAÇÃO DE SÍMBOLOS (referência EN ISO 15223-1: Dispositivos médicos – Símbolos a serem usados com rótulos de dispositivos médicos, rotulagem e informações a serem fornecidas)

| Símbolo | Descrição |
|---|--|
|  | Número do Catálogo |
|  | Consulte as instruções para uso* |
|  | Cuidado, consulte os documentos que acompanham |
|  | Riscos Biológicos |
|  | Limitação da Temperatura |
|  | Fabricante |

Por favor, consulte a Nota de Aplicação para uso em pesquisa

HISTÓRICO DA REVISÃO

| Revisão | Data | Descrição da Revisão |
|---------|------------|--|
| 01 | 08/04/2019 | Melhoria no sistema de Controle de Documentos Internos. Nenhuma alteração no conteúdo do documento. |
| 02 | 21/09/2019 | Atualizado as informações de contato e endereço para refletir a mudança no local fabricação legal. |
| 03 | Atual | Atualizadas instruções de armazenamento para refletir frasco aberto e condições de armazenagem durante o uso. Inclusão do representante brasileiro autorizado. |