

Placas de Tipagem Tecidular Monoclonal Lambda para HLA de Classe I e Classe II



N.º de catálogo LM144, LM144A, LM144B, LM172, LM272, LM372, LM72OR, LM96, LMB2703, MDR172, MDR272



Para utilização em diagnósticos in vitro

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Para uso na determinação dos antígenos HLA de Classe I e Classe II da superfície celular com uma técnica microlinfocitotóxica dependente do complemento.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

As placas Lambda Monoclonal Typing (LMT™) HLA de Classe I e Classe II contêm uma mistura de reagentes monoclonais conhecidos e complemento de coelho que são usados para determinar a presença de antígenos HLA de Classe I ou Classe II em linfócitos T e B. Cada poço contém 1 microlitro (1 µl) de mistura monoclonal específico de complemento e 5 microlitros (5 µl) de óleo mineral pesado. Cada placa contém um controle positivo e negativo. As placas de tipagem de Classe II também incluem um anticorpo monoclonal antilinfócitos B e antilinfócitos T.

PRINCÍPIOS

Os linfócitos viáveis são incubados com uma mistura de anticorpos monoclonais de fixação de complemento e complemento. Se os linfócitos exprimirem um antígeno reconhecido por um anticorpo específico, a porção Fab do anticorpo fixa-se ao antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo. Depois destes complexos terem se formado, o C1q e Ca⁺⁺ do complemento fixam-se à porção FC do anticorpo. É necessário um anticorpo IgM para fixar uma molécula de C1q ou são necessários dois anticorpos IgG para fixar uma molécula de C1q. A fixação de C1q inicia a cascata do complemento, que conduz à lise celular com complexos antígeno-anticorpo. Numa reação negativa, os linfócitos permanecem viáveis. Numa reação positiva, os linfócitos estão mortos.

REAGENTES

A. Identificação

As placas Lambda Monoclonal Typing do HLA de Classe I ou Classe II contêm uma mistura de anticorpo monoclonal anticlasse I ou anticlasse II e complemento de coelho. Cada poço contém 1 µl de uma mistura específica de monoclonal e complemento e 5 µl de óleo mineral pesado.

Observação: As fontes monoclonais podem ser de origem murina ou humana.



B. Atenção ou Aviso

1. Designação da FDA: IVD
2. **Atenção:** 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.
3. **Aviso:** O brometo de etídio é um agente cancerígeno comprovado. Manipular com precaução adequada. Pode ser prejudicial se for absorvido pela pele. Evitar espirrar para os olhos ou para a pele ou vestuário. Manter hermeticamente fechado. Lavar cuidadosamente após manuseamento.
4. Consultar a ficha de dados de segurança de material para obter informações detalhadas.





C. Preparação dos reagentes para utilização

1. Consultar as “Instruções de utilização”.



D. Instruções de armazenamento

Armazenar os reagentes à temperatura indicada na embalagem. Usar antes do final do prazo de validade impresso.

E. Purificação ou tratamento necessários para utilização

Consultar as “Instruções de utilização”.

F. Indicações de instabilidade

A contaminação bacteriana e/ou exposição a gás carbônico irá fazer com que o pH do soro mude. Esta alteração do pH é indicada por uma alteração da cor, de cor-de-rosa para amarelo. Se ocorrer uma alteração deste tipo, descarte as placas.

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- A. Visto que são necessários linfócitos viáveis para a tipagem sorológica, o sangue deverá ser recebido e processado imediatamente após a coleta. O rendimento dos linfócitos diminui com o tempo e com temperaturas extremas. O sangue deverá ser coletado em ácido citrato dextrose (ACD) ou heparina sódica, armazenado horizontalmente à temperatura ambiente (20 a 25 °C), e processado dentro de 48 horas para um rendimento máximo dos linfócitos T e B.

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos

1. Placa(s) de tipagem de HLA Classe I ou Classe II, 72 ou 96 poços.
2. Folhas de trabalho identificando a especificidade de cada anticorpo monoclonal.

Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Microseringas
2. Lâminas de cobertura ou lâminas de vidro Insta-Seal (N.º Cat. OLI TIS250U) e óleo mineral (Vaseline™)
3. Reagentes de coloração e fixação:
 - a. Para teste de exclusão de corante: Eosin-Y (base de sódio) e formaldeído.
 - b. Para teste de fluorescência: FluoroQuench™ AO/EB (N.º Cat. OLI FQAE-100/500), FQAE-100 para teste de CFDA (seção “B” em baixo), acrescentar 1 ml EB de solução estoque a 9 ml de hemoglobina ou tinta a 1% (consultar Materiais de 4 a 7, em baixo).
4. Marcação da hemoglobina
 - a. **De soro bovino liofilizado:**
 - (1) Dissolver 10 mg de hemoglobina em 100 ml de PBS EDTA a 5%. Acrescentar 1 ml de azida sódica a 1%.
 - (2) Centrifugar durante 45 minutos a 1000 g. Armazenar o sobrenadante a -20 °C.
 - b. **De glóbulos vermelhos de sangue total**
 - (1) Solução estoque: Lavar glóbulos vermelhos aglomerados 3 vezes com solução salina. Fazer um hematócrito a 70% e congelar-descongelar. Ultracentrifugar durante 45 minutos a 20 000 g. Manter os eritrócitos em solução salina durante 3 dias.
 - (2) Solução de trabalho: Acrescentar 10 ml de PBS EDTA a 5%. Acrescentar 1 ml de azida sódica a 1% a 89 ml de hemoglobina. Armazenar a -20 °C.
5. Tinta de marcação a 1%
 - a. Dissolver 1 mg de albumina sérica bovina (BSA) em 10 ml de PBS EDTA a 5%.
 - b. A 9,8 ml de BSA EDTA a PBS a 5%, acrescentar:
 - 100 µl de azida sódica a 1%
 - 100 µl de tinta de caligrafia preta Higgins
6. PBS EDTA a 5% (dissódio)
 - a. Dissolver 5 gm EDTA em 90 ml de PBS.
 - b. Ajustar o pH para 7,2 com 10 M NaOH.
 - c. Perfazer um volume final de 100 ml com PBS.

7. Solução estoque de brometo de etídio (EB): Dissolver 50 mg em 1 ml de água destilada. Acrescentar 49 ml de PBS. Aquecer em banho de água a 56 °C durante 30 minutos. Armazenar a -20 °C.
8. Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)
 - a. Solução estoque Dissolver 10 mg de CFDA em 1 ml de acetona num tubo de vidro. Armazenar a -20 °C em tubos de Beckman.
 - b. Solução de trabalho: Usar um dos seguintes:
 - Preparado em PBS a pH 7,2: Acrescentar 30 µl de solução estoque CFDA a 5 ml de PBS (pH 7,2). Armazenar a 2 a 5 °C durante um período máximo de 1 semana.
 - Preparado em PBS a pH 5,5: Acrescente 30 µl de solução estoque CFDA a 5 ml de PBS (pH 5,5). Armazenar a 2 a 5 °C durante um período máximo de 1 semana.

C. Instruções de utilização

Observação: Para métodos de isolamento de linfócitos, consultar o Manual de Procedimento do Laboratório ASH[®] ou o folheto informativo do produto para os métodos de isolamento de linfócitos FluoroBeads[™] ou LymphoKwik[™] Lambda One.

A. Testar

- a. Descongelar as placas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante 15 minutos e usar dentro de 1 hora depois de descongelar.
Aviso: Não voltar a congelar.
- b. Para cada poço, acrescentar 1 µl de uma suspensão de 2x10⁶ células/ml de linfócitos T à placa Classe I ou linfócitos B à placa de Classe II. Para teste de fluorescência com CFDA, consultar a seção "2" abaixo.
- c. Misturar as microgotas usando um misturador eletrostático ou um fio metálico.
- d. Incubar as placas à temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante 1 hora.
- e. Depois da incubação, corar e fixar as células:
 - (1) Para teste de exclusão de corante, acrescentar a cada poço:
 - 5 µl de corante eosina, seguido 2 minutos depois por 5 µl de formaldeído por poço.
 - (2) Para teste de fluorescência, acrescentar 5 µl de FluoroQuench[™] AO/EB (N.º Cat. OLI FQAE-100/500), FQZAE-100. Para teste de CFDA (seção "2" abaixo), acrescentar 5 µl por poço de hemoglobina ou tinta de marcação a 1% com brometo de etídio.
- f. Cobrir as placas com Terasaki Insta-Seal[™] (N.º Cat. OLI TIS250U). Se utilizar uma lâmina de vidro, vedar com óleo mineral aquecido. Deixar as placas repousar à temperatura de 20 a 25 °C durante 15 minutos para permitir que os linfócitos assentem. As placas de exclusão de corante podem ser armazenadas à temperatura de 2 a 5 °C durante um período máximo de 2 semanas. As placas fluorescentes podem ser armazenadas à temperatura de 2 a 5 °C no escuro durante um período máximo de 2 dias. Placas cobertas com Terasaki Insta-Seal[™] devem ser lidas no mesmo dia em que são preparados para o teste.

B. Fluorescência: Rotulagem da preparação de linfócitos com CFDA

- a. Incubar os linfócitos em 500 µl de CFDA com pH 7,2 a 37 °C durante 15 minutos ou CFDA com pH 5,5 durante 5 minutos à temperatura de 20 a 25 °C. Para linfócitos isolados com esferas magnéticas, incubar em 500 µl de CFDA com pH 5,5 à temperatura de 20 a 25 °C durante 10 minutos.
- b. Centrifugar durante 1 minuto a 1000 g. Remover o sobrenadante. Para linfócitos isolados com esferas magnéticas, colocar no magneto durante 1 minuto. Remover o sobrenadante.
- c. Voltar a suspender em PBS.
- d. Repetir os passos b e c duas vezes.
- e. Voltar a suspender as células em McCoy's com 0,5% de FCS e ajustar as células até uma concentração de 2x10⁶ células/ml. Proteger da luz.
- f. Seguir b a f do "Teste" acima.

RESULTADOS

A. Aquisição de dados

1. Irá ocorrer morte celular em qualquer poço de teste onde o antígeno HLA da superfície celular seja reconhecido pelo seu anticorpo anti-HLA correspondente. Quando se usa exclusão de corante, os linfócitos negativos (vivos) irão assumir um aspecto pequeno, luminoso e refrativo. Os linfócitos positivos

(mortos) irão assumir um aspecto escuro e não refrativo com o corante eosina. As reações são pontuadas calculando a porcentagem de morte celular.

B. Análise de dados

1. Para teste de fluorescência usando diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) ou laranja de acridina (AO), os linfócitos negativos (vivos) irão assumir um aspecto verde. Usando brometo de etídio (EB) ou iodeto de propídeo (PI), os linfócitos positivos (mortos) irão assumir um aspecto vermelho.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- As dificuldades de isolamento celular e a contaminação da preparação de linfócitos com glóbulos vermelhos, leveduras, monócitos, plaquetas ou granulócitos podem provocar resultados errados. Paralelamente, podem produzir-se resultados errados quando as concentrações celulares estiverem acima ou abaixo do nível aceitável. A contaminação bacteriana ou alteração do pH dos reagentes monoclonais podem produzir reações falso-negativas. Alguns antígenos HLA apresentam frequentemente baixas especificidades. Estes antígenos denominam-se de reação cruzada e são detalhados por antígenos e anticorpos de cada placa na folha de orientação do padrão de reação anexo.
- Em placas de tipagem de Classe II, o controle antilinfócitos B deve ser positivo para validar que a suspensão celular está enriquecida em linfócitos B. Quando este controle é inferior a uma pontuação de reação de 6, o teste não é válido.

VALORES ESPERADOS

Avaliação microscópica dos testes

As reações são pontuadas calculando-se a porcentagem de morte celular. Quando o controle negativo contém linfócitos mortos, a porcentagem de morte celular nos poços restantes devem ser ajustada de acordo.

O padrão de leitura ASHI consta do próximo quadro:

<u>Pontuação</u>	<u>Morte Celular</u>	<u>Interpretação</u>
1	0–10%	Negativo
2	11–20%	Negativo duvidoso
4	21–50%	Positivo fraco
6	51–80%	Positivo
8	81–100%	Positivo forte
0	llegível	

As frequências de fenótipo para o HLA de Classe I e Classe II irão variar entre populações diferentes (ou seja, caucasianos, afro-americanos, orientais etc.).⁴

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

A. Potência e especificidade

Os reagentes de teste foram caracterizados com rigor por rastreios sorológicos sequenciais separados. Foram utilizados painéis de referência de amostras de linfócitos congeladas em dois rastreios separados.

Dois terços de todos os reagentes selecionados são fortes com reatividade específica para o HLA claramente definida (com Índice de avidéz de 70%), permitindo não mais do que 10% de falso-positivos e 15% de falso-negativos. O terço restante dos reagentes não cumpre estes critérios, mas é útil do ponto de vista da investigação quando usado para confirmar outros anticorpos perfeitamente definidos. Os anticorpos multiespecíficos só são usados se não estiverem disponíveis anticorpos mono-específicos para uma especificidade particular. Os anticorpos multiespecíficos foram escolhidos com características de desempenho para todas as especificidades semelhantes às dos anticorpos mono-específicos. É utilizado um rastreio em relação a um painel de linfócitos recém-preparado para confirmar e validar a concentração e especificidade do soro. A análise é efetuada usando as técnicas de cálculo do Oitavo Seminário Internacional sobre Histocompatibilidade de 1980 (Eighth International Histocompatibility Workshop).⁴

B. Controle negativo

O antissoro do controle negativo é proveniente de um indivíduo saudável do sexo masculino com grupo sanguíneo AB, que não apresenta qualquer reatividade citotóxica em testes com doadores aleatórios de linfócitos. Este controle é usado para determinar a viabilidade dos linfócitos.

C. Controle positivo

O controle positivo consiste num anticorpo monoclonal e é fortemente citotóxico para os linfócitos humanos. Este controle é usado para determinar a atividade do complemento.

D. Controle antilinfócito B

O controle antilinfócito B consiste num anticorpo monoclonal e é fortemente citotóxico para linfócitos B e não reativo com plaquetas, monócitos e glóbulos vermelhos. Este controle é usado para determinar a pureza dos linfócitos B.

BIBLIOGRAFIA

1. Terasaki PI, Bernoco F, Park MS, Ozturk G, and Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA A, B, C and D antigens. Am J Clin Pathol 69: 103-120, 1978.
2. Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G. B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. In Histocompatibility Testing. Terasaki PI, Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, CA 287-288, 1980.
3. ASHI Laboratory Manual, 2nd ed. Editado por Zachary, Andrea A. e Teresi, Gary, p. 199, 1990.
4. Terasaki, PI, Ed., Histocompatibility Testing. Los Angeles, CA, 1980.
5. Nikaein A, Ed., ASHI Procedure Manual, 3rd Edition, ASHI, Lenexa, KS.

MARCAS COMERCIAIS

™ FluoroBeads, FluoroQuench, Insta-Seal, Lambda Monoclonal Trays (LMT) e LymphoKwik são marcas comerciais da One Lambda, Inc.

REPRESENTANTE AUTORIZADO NA EUROPA

EC REP MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175, Hannover, Alemanha

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

80298490007

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS (referência EN ISO 15223-1: Dispositivos médicos – Símbolos a utilizar em etiquetas de dispositivos médicos, rotulagem e informações a serem fornecidas)

Símbolo	Descrição
 ISO 7000 – N.º de reg. 1641	Consultar as instruções de utilização
 ISO 7000 – N.º de reg. 2493	Número de catálogo
 ISO 7000 – N.º de reg. 0434A	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
 ISO 7000 – N.º de reg. 0434A	Aviso, consultar os documentos incluídos
 ISO 7000 – N.º de reg. 0659	Riscos biológicos
 ISO 7000 – N.º de reg. 0633	Limite superior de temperatura
	Código de lote
 ISO 7000 – N.º de reg. 3082	Fabricante
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
 ISO 7000 – N.º de reg. 2497	Data de fabricação
 ISO 7000 – N.º de reg. 2607	Prazo de validade

O campo do lote na etiqueta destina-se à rastreabilidade do evento de fabricação

HISTÓRICO DE REVISÕES

Revisão	Data de emissão	Descrição da Revisão
01	8 de abril de 2019	Sistema de controle de documentos internos atualizado. Sem alterações no conteúdo do documento.
02	20 de setembro de 2019	Informações e endereço de contato atualizadas para refletir a alteração no local legal de fabricação.
03	Em vigor	Stain-Fix™ (N.º Cat. OLI SF-500), FluoroQuench EB™ (N.º Cat. OLI FQEB-500) removidos. N.º de catálogo 2LM72, LMB2701, LMBL72, MDR160 removidos. Em Instruções de utilização, linha C.1.b., foi removido "B". Inclusão do representante brasileiro autorizado.

