

Документацията за продукта и нейните преводи са на разположение на: WWW.IMMUCOR.COM

ЛИСТОВКА НА ПРОДУКТА

LIFECODES® C3d откриване

За ин витро диагностика.

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|---|
| <p>Определения на символите..... 1</p> <p>Предназначение..... 1</p> <p>Резюме и обяснение..... 1</p> <p>Принципи на процедурата..... 1</p> <p>Предоставени реагенти..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">А. Идентификация и условия за съхранение..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">Б. Предупреждения и предпазни мерки..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">В. Пречистване или обработка за употреба..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">Г. Показания за нестабилност..... 2</p> | <p>Необходими, но непредоставени материали..... 2</p> <p>Вземане и подготовка на проби..... 3</p> <p>Инструкции за употреба..... 3</p> <p>Резултати 4</p> <p>Качествен контрол..... 4</p> <p>Ограничения на процедурата..... 5</p> <p>Отстраняване на проблеми..... 5</p> <p>Специфични работни характеристики Литература..... 6</p> <p>Литература..... 6</p> <p>Производител и упълномощен представител..... 6</p> |
|--|---|

ОПРЕДЕЛЕНИЯ НА СИМВОЛИТЕ

(Етикети на продукта и допълнителни документи)

Номер на партида



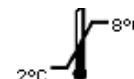
Каталожен номер



Срок на годност



Температурен диапазон (съхранение)



Производител



Чувствителен към светлина (Да се пази от светлина)



Температура (съхранение)



Достатъчен за N тестове



Упълномощен представител за Европейската общност



Предупреждение



ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

LIFECODES® C3d откриване е тест за качествено откриване на свързването на комплемент с комплекса антитяло/антиген в човешки серум.

РЕЗЮМЕ И ОБЯСНЕНИЕ

Този продукт е предназначен за откриване на свързването на C3d комплемента с комплекса антитяло/антиген. Продуктът съдържа РЕ-конюгирано античовешко C3d антитяло, сфера за положителна контрола, комплемент, съдържащ човешки серум, и буфер за промиване.

ПРИНЦИПИ НА ПРОЦЕДУРАТА

Аликвотна част от свързани в сфери HLA антигени се инкубира с малка проба от тестов серум. След тази първоначална инкубация се добавя серум за отрицателна контрола като източник на комплемент за допълнително инкубиране. Сенсибилизираните сфери след това се измиват за отстраняване на свободното антитяло. След това се добавя античовешко C3d антитяло, конюгирано с фикоеритрин. След още една инкубация тестовата проба се измива, разтваря и анализира с апарата Luminex. Силата на сигнала от всяка сфера на тестовата проба се сравнява със силата на сигнала на серума за отрицателна контрола, за да се определи дали пробата е положителна или отрицателна за C3d свързване към комплекса антитяло/антиген.

ПРЕДОСТАВЕНИ РЕАГЕНТИ

А. Идентификация и условия за съхранение С3d откриване продуктово номер 265400

1. **C3dCJ** С3d конюгат (продуктово номер 265410; 1200 µL). PE-конюгирано античовешко С3d анти тяло в готов за употреба буфер за съхранение на фосфатна основа, съдържащ NaCl, Tween-20 и натриев азид. ЧУВСТВИТЕЛЕН КЪМ СВЕТЛИНА. Да се пази от излагане на директна светлина за продължителни периоди от време. **Да се съхранява при температура от 2 до 8°C на тъмно до 3 месеца или при температура ≤-65°C до изтичане на срока на годност.** Може да бъде замразяван отново до 6 пъти при температура ≤-65°C след първоначалното размразяване.
2. **C3dCS** Допълнителен серум (продуктово номер 265415 ; 2 флакона x 360 µL). Серум от донор от мъжки пол, на който не е преливана кръв. **Да се съхранява при температура ≤-65°C.** Може да бъде замразяван отново до 4 пъти след първоначалното размразяване.
3. **C3dPCB** С3d сфера за положителна контрола (продуктово номер 265405; 24 µL). Буферът за съхранение е буфер на фосфатна основа, съдържащ NaCl, Tween-20, натриев азид и говежди протеини. ЧУВСТВИТЕЛЕН КЪМ СВЕТЛИНА. **Да се съхранява при температура ≤-65°C.** Може да бъде замразяван отново до 6 пъти след първоначалното размразяване.
4. **LMWB** буфер за промиване (продуктово номер 628221; 30 mL): Буфер на база фосфат, съдържащ NaCl, Tween-20, натриев азид и говежди серумен албумин. **Съхранявайте при температура от 2 до 8°C** и го оставете да достигне стайна температура (от 20 до 24°C) преди употреба.

Б. Предупреждения и предпазни мерки

1. За ин витро диагностика.
2. Използваният за производството на този комплект материал е изследван чрез одобрени от АХЛ методи и е показал отрицателен резултат за анти тяло към HIV, HCV и HBsAg. Въпреки това, нито един метод на изследване не може да даде пълна гаранция за липса на инфекциозни агенти. Поради тази причина, **използвайте универсални предпазни мерки** при работа с тези материали.
3. Реагентите съдържат 0,1% натриев азид като консервант, който може да влезе в реакция с оловни и медни водопроводни тръби и да образува експлозивни метални азиди. Използвайте големи количества вода, когато изхвърляте материали в мивка.
4. Бактериалното замърсяване на пробите или наличието на имунни комплекси или други съединения на имуноглобулин може да доведе до увеличено неспецифично свързване и погрешни резултати.
5. Изхвърляйте след употреба всички материали според местните разпоредби.
6. За допълнителна информация вижте информационните листове за безопасност.
7. Допълнителният серум, оставен при температура от 2 до 8°C за продължителен период от време, показва намалена комплементна активност.
8. Сферите и конюгатът са ЧУВСТВИТЕЛНИ КЪМ СВЕТЛИНА. Ограничавайте излагането им на светлина до три часа или по-малко.

В. Пречистване или обработка за употреба

1. Вижте раздела „Вземане и подготовка на проби“.
2. Всички компоненти са готови за употреба и не изискват разтваряне.

Г. Показания за нестабилност

1. Не използвайте компоненти или контроли, които са мътни или с изтекъл срок на годност.

Необходими, но НЕ ПРЕДОСТАВЕНИ МАТЕРИАЛИ, РЕАГЕНТИ И ОБОРУДВАНЕ

- Комплекти LIFECODES LSA клас I (продуктово номер 265100, LSA1) или LIFECODES LSA клас II (продуктово номер 265200, LSA2).
- Оборудване, необходимо за провеждането на теста LIFECODES LSA клас I или клас II (вижте съответната продуктова листовка, LC1683CEBG)

ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ И ПОДГОТОВКА НА СЕРУМА

Вземането на кръв се извършва без антикоагулант, с използване на асептична техника. Кръвта трябва да се тества докато е още прясна или да се съхранява по подходящ начин, за да се минимизира вероятността от получаване на лъжлива положителна или лъжливо отрицателна реакция поради неправилно съхранение или замърсяване на пробата. Серумът трябва да се съхранява при температура от 2 до 8°C за не повече от 48 часа. Ако серумът ще се съхранява повече от 48 часа, той трябва да се замрази при температура -20°C или по-ниска, или при температура -80°C за не повече от 2 години. Отделните лаборатории трябва да въведат и утвърдят методи за съхраняване на серуми за срок над 2 години. Серумът трябва да бъде отделен от еритроцитите, когато се съхранява или транспортира. Избягвайте повтарящо се замразяване и размразяване на серумните проби.

ВНИМАНИЕ: Не използвайте микробиологично замърсени, хемолизирани или липемични серуми, тъй като такива проби могат да дадат противоречиви резултати.

Преди провеждането на тест всички проби трябва да бъдат разбъркани с вортекс-миксер и центрофугирани за кратко (30 секунди при ~10 000xg), за да се утаят всякакви твърди частици, които могат да присъстват.

ИНСТРУКЦИИ ЗА УПОТРЕБА

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ:

- ТРЯБВА да внимавате да не замърсите буфера за промиване и античовешкия C3d реагент. Непреднамереното замърсяване на тези реагенти с човешки серум може да доведе до неуспех на теста.
- Всеки тест трябва да включва серумни проби за положителна и отрицателна контрола, за да може да се определи появата на техническа грешка или неуспешна реакция на реагент.
- Допълнителният серум представлява отрицателен серумен реагент, необходим за провеждането на теста за откриване на C3d като стандартен източник на комплемент.
- В допълнение към това, спазвайте общите предпазни мерки, описани в продуктовата листовка LIFECODES LSA (LC1683CEBG).

1. Включете апарата Lumineх за 30 минути, за да загрее.
2. Извадете LSA сместа от сфери, C3d сферата за положителна контрола (C3dPCB), C3d допълнителния серум (C3dCS) и C3d конюгата (C3dCJ) от фризера с температура -65°C и ги съхранявайте на тъмно, при стайна температура до размразяването им. След това веднага ги поставете върху лед и защитете от светлина.
3. Оставете буфера за промиване да достигне стайна температура (от 20 до 24°C) преди употреба. През това време използвайте таблицата за форматиране на таблата (LC979), за да зададете позицията върху таблата за всеки един серум и всяка една контрола, които ще бъдат анализирани. **Отрицателният контролен серум (доставян заедно с комплектите LSA1 и LSA2) се използва като отрицателна контрола.**
4. Затворете ямките на филтърната табла без позиции с лепящите се пластмасови капачета. Навлажнете предварително ямките, които ще се използват, с 100-300 µL дестилирана вода. След 2-5 минути отстранете водата чрез плавна аспирация с помощта на вакуумния колектор. (Вижте инструкциите на производителя за правилна употреба).
5. Подгответе LSA сферите чрез кратко (30 секунди) центрофугиране на флакона при ~600 – 800 x g, за да отстраните всички сфери или следи от течност от капачето или стените на флакона. Разбъркайте с вортекс-миксер (~1 минута) за равномерно повторно суспендиране на сферите. В отделен флакон смесете 1 µL/проба от C3dPCB със съответния обем LSA сфери (40 µL/проба). Разбъркайте с вортекс-миксер (~1 минута) за равномерно повторно суспендиране на сферите.
6. Добавете 40 µL от LSA сместа от сфери и C3dPCB към всяка една от ямките с позиции. Разбърквайте отново с вортекс-миксер флакона с LSA сфери на всеки 2 минути, за да поддържате сферите суспендирани, докато ги разпределяте. След това центрофугирайте серума (30 секунди при ~10,000 x g) и добавете 10 µL от серума или контролния серум и смесете.

ВНИМАНИЕ: Важно е да поддържате сферите суспендирани, за да се гарантира аликвотно разпределяне на достатъчно количество сфери в ямките и необходимостта от малко време за броене. Ако не разбърквате сферите периодично с вортекс-миксер, те ще се утаят на дъното на епруветката. Това ще доведе до разпределяне на диференциално количество сфери в ямките, което може да повлияе значително върху времето за работа и анализ на резултатите.

7. Покрийте таблата с лепящия се пластмасов капак, след което я обвийте с фолио или поставете в кутия за защита от светлина. Инкубирайте за 30 минути при стайна температура (20-24°C) на тъмно, върху въртяща се платформа (200 завъртания в минута). Върнете неизползваните порции контролен серум за съхранение при от 2 до 8°C. Върнете неизползваните порции LSA смес от сфери и C3dPCB за съхранение при температура ≤-65°C на тъмно.
8. След 30 минути инкубация свалете пластмасовия капак и добавете 30 µL от C3dCS във всяка ямка, в това число и в ямката за отрицателна та контрола. Върнете **C3dCS за съхранение при температура ≤-65°C веднага след употреба.** Обвийте таблата с фолио или я поставете в кутия за защита от светлина. Поставете върху въртяща се платформа (с настройка за 200 завъртания в минута) или внимателно разбърквайте с вортекс-миксер на всеки 5-10 минути. Инкубирайте за 30 минути при стайна температура (от 20 до 24°C).

9. След 30 минути инкубация свалете лепящия се пластмасов капак и добавете 100 µL от буфера за промиване във всяка ямка. Смесете чрез потупване на таблата отстрани и внимателно аспирирайте таблата.

ВНИМАНИЕ: Прекалената сила на вакуум ще доведе до залепване на сферите към мембраната и неуспех на пробата. Прилагайте минималното вакуумно налягане, необходимо за аспириране на пробите.

10. Добавете 250 µL от буфера за промиване във всяка ямка, аспирирайте и повторете същата процедура още три пъти.

ВНИМАНИЕ: Недостатъчното промиване може да намали способността на конюгата да открива C3d свързането към комплекса антияло/антиген и да доведе до лъжливи отрицателни резултати.

11. Центрофугирайте C3dCJ за 30 секунди в микроцентрофуга (~600 – 800 x g). C3dCJ е готов за употреба и не изисква разтваряне. Добавете 50 µL от C3dCJ във всяка ямка. Съхранявайте останалото количество C3dCJ при 4°C до три месеца или го съхранявайте при температура ≤-65°C до изтичането на срока на годност.
12. Обвийте таблата с фолио или я поставете в кутия за защита от светлина. Поставете я върху въртяща се платформа (с настройка за 200 завъртания в минута) или внимателно разбърквайте с вортекс-миксер на всеки 5-10 минути. Инкубирайте за 30 минути при стайна температура (от 20 до 24°C).
13. След 30 минути инкубация свалете лепящия се пластмасов капак и добавете 100 µL от буфера за промиване във всяка ямка. Смесете чрез потупване на таблата отстрани и внимателно аспирирайте таблата.
14. Добавете 250 µL от буфера за промиване във всяка ямка и аспирирайте.
15. Като използвате чист накрайник на пипета, добавете 200 µL от буфера за промиване във всяка ямка и смесете за повторно суспендиране на сферите.
16. Съберете данни с апарата Luminex, като спазвате препоръките на производителя и **използвайте Luminex C3d шаблон (вижте LIFECODES LSA относно специфична за партидата информация)**. Закъснения над 3 часа при стайна температура могат да увеличат вероятността за получаване на лъжливо положителни или лъжливо отрицателни реакции. Върнете неизползаното количество буфер за промиване за съхранение при температура от 2 до 8°C.

РЕЗУЛТАТИ

C3d откриване: За да анализирате резултатите за партида от проби:

- Създайте работна таблица в Excel чрез отваряне на копие от изходния CSV файл с резултатите от партидата на апарата Luminex и „Запазване като“ Excel файл. Този файл ще се използва за изчисленията, необходими за анализ на резултатите.
- От специфичната за партидата работна таблица, доставяна заедно с LSA комплекта, копирайте името на антигена, който съответства на всяка сфера.
- След това извадете MFI стойностите на серума за отрицателна контрола (MFI на серума за ОК) от НЕКОРИГИРАНИТЕ MFI стойности за всяка отделна сфера, за да изчислите фоновия коригиран MFI (фонов коригиран).

(а) Фонов коригиран MFI = MFI на проба – MFI на серум за ОК

- След това разделете фоновия коригиран MFI на MFI на изчислената контрола (CalcCON) за нейния съответен локус, за да определите фоновото коригирано съотношение (BCR-Neg). CalcCON за всеки локус представлява некоригираната MFI стойност на най-ниско класираната сфера с антиген за този локус.

(б) BCR-Neg = $\frac{\text{фонов коригиран MFI на антиген}}{\text{най-ниска некоригирана MFI стойност на локус}}$

- Накрая разделете фоновия коригиран MFI на антигена на съответната MFI стойност на антигена за LSA серума за отрицателна контрола (ОК), за да определите относителната сила (R-сила).

(в) R-сила = $\frac{\text{фонов коригиран MFI на антиген}}{\text{некоригирана MFI стойност на антиген}}$

Сферата се смята за положителна, ако две или повече от коригираните стойности са над праговите стойности. Вижте сертификата за анализ на продукта C3d откриване (265400) за стойностите на положителните и отрицателните прагове. По-висока или по-ниска чувствителност може да се получи чрез коригиране на прага.

КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

Качественият контрол на C3d откриването е вграден в системата на теста чрез включването на сфера за положителна контрола и серум за положителна и отрицателна контрола (предоставен с комплектите LSA1 и LSA2). Тези контроли трябва да се включват във

всеки един тест, за да може да се определи появата на техническа грешка или неуспешна реакция на реагентите. Серумът за положителна контрола ще реагира с определен брой LSA конюгирани сфери, генерирайки шаблон, подобен на този в графиката на C3d откриването. Серумът за отрицателна контрола ще реагира с незначителен или никакъв брой LSA конюгирани сфери. Сферата за положителна контрола на C3d би трябвало да покаже стойности на MFI $\geq 10\ 000$ при тест с използване на серум за отрицателна контрола. Стойности на проба под 10 000 MFI могат да сочат добавяне на недостатъчно количество C3dCJ, лошо промиване по време на теста или компрометиране на C3dCJ. Броят на сферата трябва да включва поне 40 събития.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

Погрешни резултати могат да се получат при бактериално замърсяване на тестовите материали, неподходящи периоди на инкубация, недостатъчно промиване или декантиране на сферите, излагане на C3dCJ на светлина или пропускане на тестови реагенти или стъпки.

Наличието на имунни комплекси или други съединения на имуноглобулин в серумните проби може да доведе до неспецифично свързване и получаване на погрешни резултати за този тест.

Серумните титри за антитела са специфични за проба и момент от време. Ако много сфери показват стойности на MFI над 15 000, може да се наложи да разтворите серума.

Поради комплексния характер на HLA тестването и наличието на множество фактори, които могат да повлияят върху комплементната каскада и да доведат до образуването на C3d, резултатите трябва да се разглеждат и интерпретират от квалифициран персонал. Използването на каквито и да е контролни серуми и прагови стойности, различни от посочените в сертификата за анализ, не е потвърдено.

Този тест не трябва да се използва като единствена основа за вземането на клинични решения.

ОТСТРАНЯВАНЕ НА ПРОБЛЕМИ

(Вижте също листовката за продукта LIFECODES LSA клас I и клас II LC1683CEBG).

| ПРОБЛЕМ | ВЕРОЯТНА ПРИЧИНА | РЕШЕНИЕ |
|---|---|--|
| Малък брой сфери само за C3dPCB | Недостатъчно количество сфери е добавено към LSA сместа със сфери | Използвайте вортекс-миксер за повторно суспендиране, избягвайте пипетиране <3 μ L, използвайте калибрирани пипети |
| | Апаратът не функционира – не е калибриран | Вижте ръководството за Luminex |
| | Обезцветени от светлина сфери | Използвайте нов флакон с C3dPCB |
| C3d стойности на MFI при положителна контрола със серум <10 000 MFI | Обезцветен от светлина C3dCJ или недостатъчно количество от него е добавено към реакцията | Повторете теста. Използвайте нов флакон с C3dCJ |
| | Лошо промиване | Повторете теста и следете промиванията |
| Нисък MFI на серума за положителна контрола | Добавяне на грешна проба | Повторете теста с правилната контролна проба |
| | Недостатъчно количество C3dCJ е добавено към реакцията | Повторете теста с правилното количество C3dCJ |
| | Недостатъчно количество C3dCS или той не е бил добавен към реакцията | Повторете теста с добавяне на C3dCS |
| | Ниска температура на теста | Потвърдете провеждането на теста при 20°C-24°C. Опитайте по-висока граница на температурния диапазон за по-високи MFI стойности. |
| Аномален шаблон на серума за положителна контрола | Добавяне на грешна проба | Повторете теста с правилната контролна проба |
| | Лошо промиване | Повторете теста и следете промиванията |
| Висок MFI на серума за отрицателна контрола (>1500 MFI) | Лошо промиване | Повторете теста и следете промиванията, за да се уверите, че сферите са суспендирани повторно по време на промиването |
| | | Намалете силата на вакуума |

СПЕЦИФИЧНИ РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Когато тестът LIFECODES C3d откриване се използва съгласно описаната по-горе процедура, резултатите разкриват наличието или липсата на комплемент, свързан с комплекса антияло/антиген.

Проведено е сравнително изследване с 142 проби между тестовите LIFECODES C3d откриване и „Зависима от комплемент цитотоксичност“ (CDC). За този набор от проби чувствителността на теста LIFECODES C3d откриване беше по-добра от тази на теста CDC за откриване на свързването на комплемент с HLA антияло в положителните серумни проби, както е измерено от тестовите LIFECODES LSA клас I и клас II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sicard, A. et al. Detection of C3d-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies at Diagnosis of Humoral Rejection Predicts Renal Graft Loss. *J Am Soc Nephrol*, 2015; 26(2): 457-467.
2. Thomas, K.A. et al. An Anti-C1s Monoclonal, TNT003, Inhibits Complement Activation Induced by Antibodies Against HLA. *Am J Transplant*. 2015; 15(8): 2037-2049.
3. Mueller, T.F.; Oberkofler C.E. and Clavien P.A. What's Hot, What's New at WTC—Clinical Science. *Am J Transplant*. 2015; 15(2):327-332.
4. Lan, J. et al. Clinical Relevance of C3d-Binding Donor-Specific Antibodies in Late Kidney Allograft Failure. *Am J Transplant*. 2015; 15(S3).
5. Lan, J. et al. Complement-Fixing Donor-Specific HLA Antibodies Detected By Novel C3d Assay Are Associated With Antibody Mediated Rejection in Heart Transplant Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2015; 34(4): S130.
6. Toutirais, O. et al. Clinical outcome of heart transplant recipients with complement binding donor specific antibodies. *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 431.
7. Dubois, V. et al. Pregnancy and Donor-Specific HLA-antibody-mediated humoral rejection in young women after liver transplantation: “Liaisons Dangereuses”? *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 306.
8. Wahrman, M. et al. Modified solid-phase alloantibody detection for improved crossmatch prediction. *Human Immunol*, 2013; 74(1): 32–40.
9. Sacks, S.H. and Zhou, W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nature Rev Immunol*, 2012; 12(6): 431-442.
10. Gieraj, B.; Górnicka, B.; Wasiutyński, A. Role of C3d and C4d complement fragments in the diagnostics of acute allograft rejection after transplantations. *Ann Transplant*, 2009; 14(4): 61-70.
11. Rodríguez, E.R. et al. Antibody-Mediated Rejection in Human Cardiac Allografts: Evaluation of Immunoglobulins and Complement Activation Products C4d and C3d as Markers. *Am J Transplant*, 2005; 5(11): 2778–2785.

УПЪЛНОМОЩЕН ПРЕДСТАВИТЕЛ

Упълномощен представител: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Strasse 32, 63303 Dreieich, Германия

Европейска служба за техническа поддръжка: +32/3 385 47 91

Издание: 2017-02-23

