

Dokumentace a jazykové verze jsou k dispozici na: WWW.IMMUCOR.COM

PŘÍBALOVÝ LETÁK

LIFECODES® detekce C3d

Test pro diagnostiku in vitro.

OBSAH

<p>Definice symbolů..... 1</p> <p>Účel použití..... 1</p> <p>Souhrn a vysvětlení..... 1</p> <p>Princip postupu..... 1</p> <p>Reagencie..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">A. Identifikace a skladování..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">B. Varování a upozornění..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">C. Purifikace a aplikace..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">D. Známky nestability..... 2</p> <p>Materiály, které nejsou dodány..... 2</p>	<p>Odběr a příprava vzorku..... 2</p> <p>Pokyny k použití..... 3</p> <p>Výsledky..... 4</p> <p>Kontrola kvality..... 4</p> <p>Omezení postupu..... 4</p> <p>Řešení problémů..... 5</p> <p>Zvláštní vlastnosti a chování..... 5</p> <p>Použitá literatura..... 5</p> <p>Výrobce a autorizovaný zástupce..... 5</p>
---	--

DEFINICE SYMBOLŮ

(Označení výrobku a doplňující dokumentace)

Série		Katalogové číslo		Použitelnost do		Teplotní rozsah (skladování)	
Výrobce		Výrobek je citlivý na světlo (chráňte před světlem)		Teplota (skladování)		Množství pro N testů	
Autorizovaný zástupce v rámci Evropského společenství		Varování					

ÚČEL POUŽITÍ

LIFECODES® detekce C3d je sada určená ke kvalitativní detekci navázání komplementu na komplex protilátka-antigen v lidském séru.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Tento produkt je určen k detekci navázání komplementu C3d na komplex protilátka-antigen.

Tento produkt obsahuje PE-konjugované anti-lidské C3d protilátky, kuličky pro pozitivní kontrolu, komplement obsahující lidské sérum, promývací pufr.

PRINCIP POSTUPU

Alikvot HLA-antigenů navázaných na kuličky necháme inkubovat s malým objemem testovacího séra. Po této počáteční inkubaci přidáme reagens negativního séra jakožto zdroj komplementu pro následnou inkubaci. Senzibilizované kuličky poté opláchneme, abychom odstranili nenavázané protilátky. Následně přidáme anti-lidské C3d protilátky konjugované s fykoerytrinem. Po další inkubaci je vzorek promyt, naředěn a analyzován pomocí přístroje Luminex. Intenzita signálu každé z kuliček je porovnána s intenzitou signálu séra pro negativní kontrolu za účelem stanovení, zda bude vzorek považován za pozitivní či negativní na navázání C3d na komplex protilátek-antigenů.

REAGENCIE

A. Identifikace a podmínky skladování Detekce C3d, číslo výrobku: 265400

1. **C3dCJ** Konjugát C3d (P/N 265410; 1200 µl). PE-konjugované anti-lidské protilátky C3d ve skladovacím fosfátovém pufru s obsahem NaCl připraveném k použití, Tween-20 a azid sodný. VÝROBEK JE CITLIVÝ NA SVĚTLO. Zabraňte dlouhodobému vystavení přímému světlu. **Skladujte při teplotě od 2 do 8 °C na tmavém místě po dobu až 3 měsíců, anebo při teplotě ≤-65 °C až do data expirace.** Konjugát je možné opakovaně zmrazit až 3krát na teplotu ≤-65 °C po prvním rozmrazení.
2. **C3dCS** Sérum s komplementem (P/N 265415; 2 ampulky x 360 µl). Sérum od mužského dárce bez transfúze. **Skladujte při teplotě ≤-65 °C.** Může být opakovaně (až 4krát) zmrazeno po prvním rozmrazení.
3. **C3dPCB** Kuličky pro pozitivní kontrolu C3d (P/N 265405; 24 µl). Skladovací pufr je fosfátový pufr obsahující NaCl, Tween-20, azid sodný a hovězí proteiny. CITLIVÝ NA SVĚTLO. **Skladujte při teplotě ≤-65 °C.** Může být opakovaně (až 6krát) zmrazeno po prvním rozmrazení.
4. **LSAWB** Promývací pufr LSA (P/N 265001; 25 ml). Fosfátový pufr obsahující NaCl, Tween-20 a azid sodný. **Skladujte při teplotě 2 až 8 °C** a před použitím ustalte okolní teplotu (20-24 °C).

B. Varování a upozornění

1. Test pro diagnostiku in vitro.
2. U lidského materiálu použitého k přípravě této sady byla prostřednictvím testovacích metod schválených FDA zjištěna negativita protilátek proti HIV, HCV a HBsAg. Žádná testovací metoda však nemůže jistě potvrdit nepřítomnost infekčních agens. Dodržujte proto při práci s těmito materiály **obecná bezpečnostní opatření.**
3. Reagencie obsahují 0,1 % azidu sodného (konzervační látka), který může reagovat s olověným a měděným potrubím a dát vznik výbušným azidům kovů. Při vylévání materiálu do odpadu použijte velké množství vody k jeho spláchnutí.
4. Bakteriální kontaminace vzorku nebo přítomnost imunokomplexů a jiných imunoglobulinů mohou mít za následek zvýšený výskyt nespecifických vazeb a tím pádem i neplatný výsledek.
5. Likvidace všech materiálů musí být provedena v souladu s místními nařízeními.
6. Více informací naleznete v Bezpečnostním listu materiálu.
7. Sérum s komplementem ponechané delší dobu při teplotě 2 až 8 °C vykazuje sníženou aktivitu komplementu.
8. Kuličky a konjugát jsou CITLIVÉ NA SVĚTLO. Zajistěte, aby byla doba vystavení světlu kratší než 3 hodiny.

C. Purifikace a aplikace

1. Viz „Odběr a příprava vzorku“.
2. Všechny složky jsou připraveny k použití a nevyžadují další ředění.

D. Znamky nestability

1. Nepoužívejte komponenty ani kontroly, které jsou zakalené nebo s prošlým datem trvanlivosti.

MATERIÁLY, REAGENCIE A požadované VYBAVENÍ, KTERÉ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

- Sady LIFECODES LSA I. třídy (P/N 265100, LSA1) nebo LIFECODES LSA II. třídy (P/N 265200, LSA2).
- Vybavení umožňující provedení testů LIFECODES LSA I. nebo II. třídy (viz příbalový leták příslušného produktu, LC976CE)

ODBĚR VZROKU A PŘÍPRAVA SÉRA

Odběr krevních vzorků musí být proveden bez antikoagulantů pomocí aseptické techniky a jejich testování musí být provedeno v čerstvém stavu, aby byla šance na získání falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků, způsobených nevhodným skladováním či kontaminací vzorku, minimální. Sérum musí být skladováno při teplotě 2 až 8 °C maximálně 48 hodin. V případě, že potřebujete uchovat sérum déle než 48 hodin, je třeba jej zmrazit, nebo uchovat při teplotě nižší než -20 °C, -80 °C v případě uskladnění po dobu delší než 2 roky. Laboratoř musí vytvořit a schválit metody skladování séra po dobu delší než 2 roky. Sérum musí být skladováno a přepravováno mimo dosah červených krvinek. Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků séra.

UPOZORNĚNÍ: Nepoužívejte mikrobiálně kontaminovaná, hemolyzovaná ani lipemická séra, získaná vzorky by mohly podat nejednotné výsledky.

Před zahájením testu musí být všechny vzorky promíchány krouživým pohybem a krátce odstředěny (30 vteřin při ~10 000 xg) aby byly odstraněny všechny případné hrudky.

POKYNY K POUŽITÍ

VAROVÁNÍ:

- Zvláštní pozornost je NUTNÉ věnovat zabránění kontaminace promývacího pufru a reagensů anti-lidského C3d. Náhodná kontaminace těchto reagensů lidským sérem bude mít za následek neúspěšný test.
- Každý test by měl být doprovázen vzorkem pozitivní a negativní kontroly, který umožní stanovit případný výskyt technické chyby nebo neúspěšnou reakci.
- Sérum s komplementem je negativní reakční sérum nezbytné k provedené detekce C3d, jakožto standardní zdroj komplementu.
- Dodržujte obecná opatření uvedená v příbalovém letáku pro LIFECODES LSA (LC976CE).

1. Spusťte přístroj Luminex a nechte jej zahřát po dobu 30 minut.
2. Z mrazáku nastaveného na teplotu -65 °C vyjměte směs kuliček LSA, kuličky pro pozitivní kontrolu C3d (C3dPCB), sérum obsahující komplement C3d (C3dCS) a konjugát C3d (C3dCJ) a vše umístěte na temné místo při pokojové teplotě až do rozmrazení. Po rozmrazení umístěte okamžitě na led a chraňte před světlem.
3. Promývací pufr nechte před použitím ustálit na pokojovou teplotu (20 až 24 °C). Mezitím použijte záznamový list ve formě destičky (LC979) a jednotlivým sérum a kontrolám připraveným k rozboru přiřaďte polohu na destičce. **Negativní kontrolní sérum (dodávané jako součást sad LSA1 a LSA2) slouží jako negativní kontrola.**
4. Nevyužité jamky filtrační destičky pokryjte lepícím plastovým krytem. Poté navlhčete jamky, které budou použity, 100-300 µl destilované vody. Po uplynutí 2-5 minut odstraňte vodu lehkým odsáním pomocí podtlakové odsávačky. (Viz návod použití výrobce).
5. LSA kuličky připravte krátkým (30 vteřin) odstředěním ampulky při ~600 – 800 xg, abyste odstranili kuličky a tekutinu z víčka a stěn ampulky. Důkladně protřepejte (~1 minutu), aby se kuličky rovnoměrně rozmístily. Ve zvláštní ampulce smíchejte 1 µl/vzorek C3dPCB s odpovídajícím objemem kuliček LSA (40 µl/vzorek). Důkladně protřepejte (~1 minutu). Aby se kuličky rovnoměrně rozmístily.
6. Do každé přiřazené destičky přidejte 40 µl směsi kuliček LSA s C3dPCB. Každé 2 minuty znovu protřepejte ampulku s kuličkami LSA, aby kuličky zůstaly v roztoku během jejich rozdělování. Sérum odstředte (30 vteřin při ~10 000 xg) a přidejte 10 µl séra nebo kontrolního séra a promíchejte.

UPOZORNĚNÍ: Je důležité nechat kuličky rozptýlit, aby beze zbytku obsadily jamky a usnadnily tak výpočty. V případě, že nebudou kuličky průběžně protřepávány, zůstanou na dně zkumavky. To bude mít za následek umístění různých počtů kuliček v jamkách, což může nepříznivě ovlivnit výpočty a rozbor výsledků.

7. Pokryjte destičku přilnavým plastovým krytem a poté fólií nebo víkem, aby byla chráněna před světlem. Inkubujte po dobu 30 minut při pokojové teplotě (20 °C až 24 °C) na tmavém místě pomocí rotační platformy (200 otáček za minutu). Nevyužité dávky kontrolního séra a kuliček uchovejte pro budoucí použití při teplotě 2 °C až 8 °C. Nepoužité zbytky směsi kuliček LSA a C3dPCB uložte na tmavé místo při teplotě ≤-65 °C pro budoucí použití.
8. Po 30 minutách inkubace sejměte plastový kryt a do každé jamky přidejte 30 µl C3dCS, včetně jamky pro negativní kontrolu. **Ihned po použití umístěte C3dCS zpět do mrazáku nastaveného na ≤-65 °C.** Destičku přikryjte fólií nebo víkem, aby byla chráněna před světlem. Umístěte na rotační platformu (nastavit na 200 otáček za minutu) nebo jemně míchejte krouživým pohybem každých 5-10 minut. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (20 °C až 24 °C).
9. Po 30 minutách inkubace odstraňte plastovou fólii a do každé jamky přidejte 100 µl promývacího pufru. Promíchejte jemným poklepáním na boční stranu destičky a jemně destičku odsajte.

UPOZORNĚNÍ: Příliš vysoká podtlaková síla způsobí přilepení kuliček k membráně, což může mít za následek neplatný vzorek. Při odsávání vzorku vynakládejte co nejmenší podtlakovou sílu.

10. Přidejte 250 µl promývacího pufru do každé jamky, odsajte a opakujte ještě třikrát.

UPOZORNĚNÍ: Nedostatečné promytí může mít za následek snížení schopnosti konjugátu detekovat C3d vazby na komplex protilátek s antigeny a způsobit falešně negativní výsledky.

11. Umístěte C3dCJ na 30 vteřin do mikrocentrifugy (~600 – 800 x g). C3dCJ je připraven k použití a nevyžaduje žádné další ředění. Do každé jamky přidejte 50 µl C3dCJ. Zbývající C3dCJ skladujte při teplotě 4 °C po dobu až tří měsíců, nebo při teplotě ≤-65 °C až do data expirace.
12. Destičku přikryjte fólií nebo víkem, aby byla chráněna před světlem. Umístěte na rotační platformu (nastavit na 200 otáček za minutu) nebo jemně míchejte krouživým pohybem každých 5-10 minut. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (20 až 24 °C).
13. Po 30 minutách inkubace odstraňte plastovou fólii a do každé jamky přidejte 100 µl promývacího pufru. Promíchejte jemným poklepáním na boční stranu destičky a jemně destičku odsajte.
14. Do každé jamky přidejte 250 µl promývacího pufru a odsajte.

15. Pomocí čisté pipetovací špičky umístěte do každé jamky 200 µl promývacího pufru a promíchejte kuličky, aby se rozptýlily.
16. Pomocí přístroje Luminex proveďte sběr dat v souladu s pokyny výrobce a použijte **šablonu Luminex C3d (informace týkající se příslušné sady získáte od LIFECODES LSA)**. Po třech hodinách při pokojové teplotě se zvyšuje šance, že získáte falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Nevyužitou dávku promývacího pufru uskladněte pro budoucí použití při teplotě 2 °C až 8 °C.

VÝSLEDKY

Detekce C3d: Rozbor výsledků jednotlivých vzorků:

1. V Excelu vytvořte pracovní list tak, že otevřete kopii získaného souboru CSV ze sady Luminex a „uložte jako“ Excelový soubor. Tento soubor bude sloužit k výpočtům použitým k rozboru výsledků.
2. Ze záznamového listu pro jednotlivé sady, dodávaného jako součást soupravy LSA, zkopírujte název protilátky, která odpovídá jednotlivým kuličkám.
3. Následně odečtěte hodnoty MFI séra pro negativní kontrolu (MFI séra NC) od HRUBÉ hodnoty MFI pro jednotlivé kuličky, abyste získali MFI upravené pro pozadí (BG-upravené).

$$(a) \text{ BG-upravené MFI} = \text{MFI vzorku} - \text{MFI séra NC}$$

4. Poté vydělte BG-upravené MFI hodnotou MFI kontroly (CalcCON) příslušného lokusu, abyste získali poměr přizpůsobený pozadí (BCR-Neg). Hodnota CalcCON pro jednotlivé lokusy je hrubá hodnota MFI nejnižše hodnocené kuličky s antigenem pro daný lokus.

$$(b) \text{ BCR-Neg} = \frac{\text{BG-upravené MFI antigenu}}{\text{Nejnižší hrubá hodnota MFI lokusu}}$$

5. Nakonec vydělte BG-upravené MFI antigenu odpovídající hodnotou MFI antigenu pro sérum pro negativní kontrolu LSA (NC), abyste získali relativní sílu (R-síla).

$$(c) \text{ R-síla} = \frac{\text{BG-upravené MFI antigenu}}{\text{Hrubá hodnota MFI antigenu}}$$

Kulička je hodnocena jako pozitivní, pokud se dvě či více nastavených hodnot nacházejí nad mezními hodnotami. Obratě se na Potvrzení rozboru (Certificate of Analysis) produktu určeného k detekci C3d (265400), kde jsou uvedeny přednastavené pozitivní a negativní mezní hodnoty. Větší nebo menší citlivost získáte upravením mezní hodnoty.

KONTROLA KVALITY

Kontrola kvality detekce C3d je součástí testovacího systému díky v podobě kuliček pro pozitivní kontrolu a séra pro negativní kontrolu (součást sad LSA1 a LSA2). Tyto kontroly by měly být součástí každého testu, aby bylo možno stanovit případný výskyt technické chyby nebo neúspěšnou reakci. Pozitivní kontrolní sérum bude reagovat s velkým množstvím LSA konjugovaných kuliček a vytvoří vzorec odpovídající vzorci v detekční tabulce C3d. Negativní kontrolní sérum bude reagovat jen s několika LSA konjugovanými kuličkami, nebo s žádnou. Kuličky pro pozitivní kontrolu C3d by měly dosáhnout hodnot MFI $\geq 10\,000$ v rámci pokusu se sérem pro negativní kontrolu. Hodnoty vzorků nižší než $10\,000$ MFI mohou znamenat, že byla přidána nedostatečná dávka C3dCJ, směs byla nedostatečně propláchnuta, případně že vzorek C3dCJ je kontaminován. Počet kuliček musí být nejméně 40x.

OMEZENÍ POSTUPU

Chybné výsledky mohou být způsobeny bakteriální kontaminací testovacího materiálu, nedodržením inkubačních dob, nedostatečným promýváním, usazením kuliček, vystavením C3dCJ přímému světlu, nepřidáním testovacích reagentů nebo nedodržením jednotlivých kroků.

Přítomnost imunokomplexů a jiných imunoglobulinů ve vzorku séra může mít za následek zvýšený výskyt nespecifických vazeb a tím pádem i neplatný výsledek testu.

Titry protilátek séra jsou závislé na vzorku a na daném okamžiku. V případě, že velké množství kuliček produkuje hodnoty MFI vyšší než $15\,000$, může být nutné sérum naředit.

S ohledem na složitou povahu testování HLA a četné faktory, které mohou ovlivnit kaskádu komplementu a způsobit tvorbu C3d, by měla být interpretace dat provedena a ověřena zkušenými pracovníky. Použití jiného kontrolního séra a mezní hodnot jiných, než jaké jsou uvedeny v potvrzení rozboru, nebylo schváleno.

Tento test nesmí být použit jako jediný a výhradní podklad pro klinické závěry.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

(Viz také příbalový leták LIFECODES LSA I. a II. třídy LC976CE).

PROBLÉM	MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Nízký počet kuliček jen pro C3dPCB	Nedostatečné množství kuliček přidanych do směsi LSA	Pulzní třepání umožňující úplné rozptýlení, vyhněte se pipetování <3 µl, použijte kalibrované pipety
	Špatná funkce přístroje - špatná kalibrace	Viz příručka k přístroji Luminex
	Osvícené kuličky	Použít novou ampulku s C3dPCB
Hodnoty pozitivní kontroly C3d MFI se sérem <10 000 MFI	Osvícení nebo nedostatečné množství C3dCJ při reakci	Opakovat pokus Použít novou ampulku s C3dCJ
	Nedostatečné promytí	Opakujte pokus a sledujte mytí
Nízká hodnota MFI pro pozitivní kontrolní sérum	Přidán nesprávný vzorek	Opakujte pokus se správným kontrolním vzorkem
	Nedostatečné množství C3dCJ při reakci	Opakujte pokus se správnou dávkou C3dCJ
	Nedostatečné množství C3dCS, případně nepřidáno do reakce	Opakujte pokus s přidáním C3dCS
	Nízká teplota při pokusu	Ujistěte se, že pokus probíhá při teplotě 20-24 °C. Pro vyšší MFI vyzkoušejte vyšší teplotní mez.
Neobvyklý vzorec pro pozitivní kontrolní sérum	Byl přidán nesprávný vzorek	Proveďte znovu se správným kontrolním vzorkem
	Nedostatečné promytí	Opakujte pokus a sledujte promývání
Vysoká hodnota MFI pro negativní kontrolní sérum (>1500 MFI)	Nedostatečné promytí	Opakujte a sledujte promývání, aby se kuličky během promývání rozptýlily
		Snižte sílu podtlaku

ZVLÁŠTNÍ CHOVÁNÍ

Pokud je sada LIFECODES detekce C3d použita v souladu s výše uvedeným postupem, prokáží výsledky pokusu přítomnost nebo nepřítomnost navázání komplementu na komplex protilátky-antigenů.

Byla provedena srovnávací studie, během níž bylo uplatněno 142 vzorků mezi LIFECODES detekcí C3d a CDC (cytotoxicita závislá na komplementu). V případě této sady vzorků byla citlivost LIFECODES detekce C3d lepší než test CDC v případě detekce návaznosti protilátky HLA ve vzorcích se sérem pro pozitivní kontrolu na základě měření pomocí LIFECODES LSA I. a II. třídy.

POUŽITÁ LITERATURA

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. Gierej, 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. Rodriguez, 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.

VÝROBCE A AUTORIZOVANÝ ZÁSTUPCE

Výrobce: Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 Spojené státy americké
Telefon: 001-203-328-9500, nebo volání bez poplatku ve Spojených státech amerických, Kanadě a Portoriku 888-329-0255;
Fax: 001-203-328-9599

Autorizovaný zástupce: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322
Tel.: (+49) 6074-84 20 -0, Fax: (+49) 6074-84 20-99

Technický servis pro Evropu: +32/3 385 47 91

Vydáno: Rev. 0, 2015-08-21

