

Produktdokumentation og oversættelser kan hentes på: WWW.IMMUCOR.COM

INDLÆGSSEDDEL

LIFECODES® C3d Detection







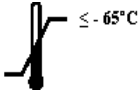



Til in vitro-diagnostik

INDHOLDSFORTEGNELSE

<p>Definition af symboler..... 1</p> <p>Tilsligtet brug..... 1</p> <p>Oversigt og forklaring..... 1</p> <p>Principper for proceduren..... 1</p> <p>Vedlagte reagenser..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">A. Identifikation og opbevaring..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">B. Advarsler og forholdsregler..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">C. Oprensning eller behandling til brug.... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">D. Indikationer for ustabilitet..... 2</p> <p>Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt..... 2</p>	<p>Prøvetagning og forberedelse..... 2</p> <p>Brugsanvisning..... 3</p> <p>Resultater..... 4</p> <p>Kvalitetskontrol..... 4</p> <p>Indgrebets begrænsninger..... 4</p> <p>Fejlfinding..... 5</p> <p>Specifikke performanceegenskaber..... 5</p> <p>Litteraturhenvisninger..... 5</p> <p>Producent og autoriseret repræsentant.. 6</p>
---	--

DEFINITION AF SYMBOLER:

(Produktmærkning og supplerende dokumenter)

Batchkode		Katalognummer		Anvendes inden		Temperatur-interval (opbevaring)	
Producent		Lysfølsom (Skal beskyttes mod lys)		Temperatur (opbevaring)		Nok til N tests	
Repræsentant i EU		Advarsel					

TILSIGTET BRUG

LIFECODES® C3d Detection er en kvalitativ analyse til detektering af komplement bundet til antistof-/antigenkomplekser i humant serum.

OVERSIGT OG FORKLARING

Dette produkt er beregnet til at detektere C3d komplement bundet til antistof-/antigenkompleks.

Dette produkt indeholder PE-konjugeret anti-humant C3d antistof, positiv kontrolperle, komplement indeholdende human sera og vaskebuffer.

PRINCIPPER FOR PROCEDUREN

En afmålt mængde perlebundet HLA-antigener inkuberes med en lille mængde testserumprøve. Efter denne indledende inkubation tilsættes negativt serumreagens som en komplementkilde til endnu en inkubation. De sensibiliserede perler vaskes derefter for at fjerne ubundet antistof. Derefter tilsættes et phycoerythrin-konjugeret anti-humant C3d-antistof. Efter endnu en inkubation vaskes og fortyndes testprøven og analyseres på Luminex-instrumentet. Signalintensiteten fra hver perle for testprøven sammenlignes med signalintensiteten af negative kontrolsera for at afgøre, om prøven skal anses som positiv eller negativ for C3d bundet til antistof-/antigenkompleks.

MEDFØLGENDE REAGENSER

A. Identifikation og opbevaringsinstruktioner

C3d detektion produktnummer 265400

1. **C3dCJ** C3d-konjugat (P/N 265410; 1200 µl). PE-konjugeret anti-humant C3d antistof i en fosfatbaseret opbevaringsbuffer, der er klar til brug og indeholder NaCl, Tween-20 og natriumazid. LYSFØLSOM. Må ikke udsættes for direkte lys i længere tid ad gangen. **Opbevares ved 2 to 8°C i mørke i op til 3 måneder ved ≤-65 °C frem til udløbsdatoen.** Det kan fryses op til 6 gange ved ≤-65 °C efter den første optøning.
2. **C3dCS** Komplementserum (varenummer 265415; 2 hætteglas x 360 µl). Serum fra ikke-transfunderet mandlig donor. Skal opbevares ved ≤-65 °C. Det kan fryses op til 4 gange efter den første optøning.
3. **C3dPCB** C3d positiv kontrolperle (varenummer 265405; 24 µl). Opbevaringsbufferen er en fosfatbaseret buffer, der indeholder NaCl, Tween-20, natriumazid og bovine proteiner. LYSFØLSOM. **Opbevares ved ≤-65 °C.** Den kan fryses op til 6 gange efter den første optøning.
4. **LSAWB** LSA Wash Buffer (varenummer 265001; 25 ml). En fosfatbaseret buffer, der indeholder NaCl, Tween-20 og natriumazid. **Opbevares ved 2 til 8 °C**, og tempereres til stuetemperatur (20 til 24 °C) før brug.

B. Advarsler og forholdsregler

1. Til in vitro-diagnostik.
2. De humane kildematerialer, der er anvendt til produktionen af dette kit, er blevet testet med FDA-godkendte metoder og fundet negative for antistoffer overfor HIV, HCV og HBsAg. Men ingen testmetode kan tilbyde fuldstændig garanti for fravær af smittefarlige stoffer. Der skal derfor iagttages generelle forholdsregler, når der arbejdes med disse stoffer.
3. Reagenser indeholder 0,1 % natriumazid som konserveringsmiddel. Det kan reagere med bly og kobber og danne eksplosive metalazider. Brug store mængder vand, hvis materialerne hældes ud i vasken.
4. Bakteriel kontaminering af prøver eller tilstedeværelse af immunkomplekser eller andre immunglobulinaggregater kan medføre forhøjet uspecifik binding og fejlagtige resultater.
5. Bortskaffelse af alle brugte materialer skal ske i overensstemmelse med lokale vedtægter.
6. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere oplysninger.
7. Komplementsera, der efterlades ved 2 to 8 °C i længere tid, udviser reduceret komplementaktivitet.
8. Perler og konjugat er LYSFØLSOMME. Sørg for, at arbejdet højst udsættes for lys i tre timer.

C. Oprensning eller nødvendig behandling til brug

1. Se "Prøvetagning og klargøring".
2. Alle komponenter er klar til brug og kræver ingen fortynding.

D. Indikationer for ustabilitet

1. Brug ikke komponenter eller kontroller, der er grumsede, eller som har overskredet udløbsdatoen.

NØDVENDIGE MATERIALER OG Udstyr, der ikke er vedlagt

- LIFECODES LSA klasse I (produktnummer 265100, LSA1) eller LIFECODES LSA klasse II (produktnummer 265200, LSA2)-kit.
- Udstyr, der er nødvendigt til at udføre LIFECODES LSA klasse I- eller klasse II-analyser (se tilsvarende indlægsseddel, LC976CE)

PRØVEINDSAMLING OG SERUMKLARGØRING

Blod skal indsamles uden antikoagulant ved hjælp af aseptisk teknik og skal testes, mens det er friskt eller opbevares korrekt, for at minimere risikoen for at få falsk-positive eller falsk-negative reaktioner på grund af forkert opbevaring eller kontaminering af prøven. Serum skal opbevares ved 2 til 8 °C i op til 48 timer. Hvis serum skal opbevares i mere end 48 timer, skal det nedfryses ved eller under -20 °C eller -80 °C i op til 2 år. Individuelle laboratorier skal etablere og validere metoder til opbevaring af sera i mere end 2 år. Serum skal separeres fra de røde blodlegemer under opbevaring eller transport. Undgå gentaget nedfrysning og optøning af serumprøver.

FORSIGTIG: Brug ikke mikrobiologisk kontaminerede, hæmolyserede, lipæmiske sera, da disse prøver kan udvise uensartede resultater.

Alle prøver bør omrystes og centrifugeres kortvarigt inden analysen (30 sekunder ved 10.000 xg) for at granulere eventuelt partikulært stof.

BRUGERVEJLEDNING

FORHOLDSREGLER:

- Der SKAL udvises forsigtighed for at undgå kontaminering af vaskebuffer og det anti-humane C3d-reagens. Utsigtet kontamination af disse reagenser med humant serum kan medføre testfejl.
- En prøve med positive og negative kontrolsera bør inkluderes med hver test som en hjælp til at afgøre, om der er opstået tekniske fejl eller reagensfejl.
- Komplementserum er et negativt serumreagens, der er nødvendigt til udførelse af C3d detektionsanalyse som en standard komplementkilde.
- Følg desuden de generelle forholdsregler, der er beskrevet i LIFECODES LSA indlægsseddel (LC976CE).

1. Tænd for Luminex-instrumentet og lad det varme op i 30 minutter.
2. Tag LSA perleblanding, C3d positiv kontrolperle (C3dPCB), C3d komplementserum (C3dCS) og C3d konjugat (C3dCJ) ud af -65 °C fryseren og opbevar dem i mørke ved stuetemperatur, indtil de er optøet. Når de er optøet, skal de lægges på is og beskyttes mod lys.
3. Lad vaskebufferen opnå stuetemperatur (20 til 24 °C) inden brug. Brug i mellemtiden pladeformatarket (LC979) til at tildele en position på pladen til hver af de sera og kontroller, der skal analyseres. **Den negative kontrolsera (vedlagt LSA1- og LSA2-kittene) anvendes som den negative kontrol.**
4. Dæk de ikke-tildelte brønde på filterpladen til med selvklæbende plastfilm. Fugt derefter de anvendte brønde med 100-300 µl destilleret vand. Fjern vandet efter 2-5 minutter ved forsigtigt at aspirere pladen vha. vakuummanifolden. (Se producentens anvisninger vedrørende korrekt brug.)
5. Klargør LSA-perlerne ved kortvarigt (30 sekunder) at centrifugere hætteglasset ved 600 – 800 x g for at fjerne eventuelle perler eller væsken fra låget eller glassets sider. Bland grundigt på vortexmixer (ca. 1 minut) for at genopslæmme perlerne ensartet. Kombiner 1 µl/prøve C3dPCB i et separat hætteglas med den korrekte mængde LSA-perler (40 µl/prøve). Bland grundigt på vortexmixer (ca. 1 minut) for at genopslæmme perlerne ensartet.
6. Tilsæt 40 µl LSA perleblanding med C3dPCB til hver testbrønd. Bland flasken med LSA-perler hver 2. minut på vortexmixer for at holde perlerne opslæmmede, mens perlerne fordeles. Centrifuger derefter serum (30 sekunder ved ~10,000 x g), og tilsæt 10 µl serum eller kontrolserum, og bland.

FORSIGTIG: Det er vigtigt at holde perlerne genopslæmmede for at sikre, at der afmåles tilstrækkelige mængder perler i brøndene og for at sikre lave tælleperioder for perlerne. Hvis perlerne ikke blandes på vortexmixer med mellemrum vil det få perlerne til at falde mod bunden af røret. Dette vil medføre en forskel i mængden af perler, der dispenseres i brøndene, og påvirke kørselstider og analysen af resultaterne negativt.

7. Dæk pladen til med selvklæbende plastfilm, og dæk den derpå med folie, eller sæt i skab for at beskytte den mod lys. Inkubér i 30 minutter ved stuetemperatur (20-24 °C) i mørke på en drejeplatform (200 omdrejninger pr. minut). Returnér ubrugte mængder kontrolsera til opbevaring ved 2 til 8 °C til senere brug. Returnér ubrugte mængder LSA perleblanding og C3dPCB til opbevaring ved ≤-65 °C i mørke til senere brug.
8. Fjern plastikfilmen efter 30 minutters inkubation, og tilsæt 30 µl C3dCS i hver brønd, inklusive den negative kontrolbrønd. Returnér **C3dCS til opbevaring ved ≤-65 °C straks efter brug.** Dæk pladen til med folie, eller stil den i skab for at beskytte den mod lys. Anbring den på en drejeplatform (indstillet til 200 omdrejninger pr. minut), eller bland forsigtigt på vortexmixer hvert 5. til 10. minut. Inkubér i 30 minutter ved stuetemperatur (20 til 24 °C).
9. Fjern plastikfilmen efter 30 minutters inkubation, og tilsæt 100 µl vaskebuffer i hver brønd. Bland ved at banke let på siden af pladen, og aspirer forsigtigt pladen.

FORSIGTIG: Brug af for meget vakuumtryk vil medføre, at perlerne klæber til membranen og kan resultere i prøvefejl. Anvend det mindst mulige vakuum til aspiration af prøverne.

10. Tilsæt 250 µl vaskebuffer i hver brønd, aspirer, og gentag tre gange til.

FORSIGTIG: Hvis der ikke vaskes helt, kan det formindske evnen for konjugatet at påvise C3d, der er bundet til antistof-/antigenkomplekset, og forårsage fejlagtige negative resultater.

11. Centrifuger C3dCJ i 30 sekunder i en mikrocentrifuge (~600 – 800 x g). C3dCJ er klar til brug og kræver ingen fortynding. Tilsæt 50 µl C3dCJ til hver brønd. Opbevar resterende C3dCJ ved 4°C i op til tre måneder, eller opbevar det ved ≤-65 °C op til udløbsdatoen.
12. Dæk pladen til med folie, eller stil den i skab for at beskytte den mod lys. Anbring den på en drejeplatform (indstillet til 200 omdrejninger pr. minut), eller bland forsigtigt på vortexmixer hvert 5. til 10. minut. Inkubér i 30 minutter ved stuetemperatur (20 til 24 °C).

13. Fjern plastikfilmen efter 30 minutters inkubation, og tilsæt 100 µl vaskebuffer i hver brønd. Bland ved at banke let på siden af pladen, og aspirer forsigtigt pladen.
14. Tilsæt 250 µl vaskebuffer i hver brønd og aspirer.
15. Tilsæt 200 µl vaskebuffer til hver brønd med en ren pipettespids, og bland for at genopslæmme perlerne.
16. Indsaml data ved brug af Luminex-instrumentet ved at følge producentens anbefalinger og **bruge en Luminex C3d-skabelon (se LIFECODES LSA for partispecifikke oplysninger)**. Forsinkelser på mere end 3 timer ved stuetemperatur kan øge risikoen for falsk-positive eller falsk-negative reaktioner. Returnér den ubrugte mængde vaskebuffer til opbevaring ved 2 til 8 °C til senere brug.

RESULTATER

C3d detektion: Analysering af resultaterne for en gruppe prøver:

1. Opret et arbejdsskema i Excel ved at åbne en kopi af outputfilen i CVS-format med resultaterne fra Luminex-gruppen og "Gem som" en Excel-fil. Denne fil vil blive brugt til de udregninger, der anvendes til at analysere resultaterne.
2. Kopiér navnet på det antigen, der svarer til hver perle, fra det partispecifikke registreringsark, der er vedlagt LSA-kittet.
3. Træk herefter MFI-værdierne for det negative kontrolserum (MFI for NC-serum) fra RAW MFI for hver individuel perle for at udregne den baggrundsjusterede MFI (BG-justeret).

(a) BG-justeret MFI = MFI for en prøve – MFI for NC-serum

4. Divider herefter den BG-justerede MFI med MFI'en for den udregnede kontrol (CalcCON) for dets respektive lokus for at generere det baggrundskorrigerede ratio (BCR-Neg). CalcCON for hvert lokus er den rå MFI-værdi for lavest rangerende antigen-perle for det lokus.

(b) BCR-Neg = $\frac{\text{BG-justeret MFI for antigen}}{\text{Laveste rå MFI-værdi for lokus}}$

5. Divider til sidst det BG-justerede MFI for antigen med den tilsvarende MFI-værdi for antigen for den LSA-negative kontrol (NC)-serum for at generere den relative styrke (R-styrke).

(c) R-styrke = $\frac{\text{BG-justeret MFI for antigen}}{\text{Rå MFI-værdi for antigen}}$

Perlen betragtes som positiv, hvis to eller flere af de justerede værdier er over stopværdierne. Se analyseattesten for C3d detektionsproduktet (265400) for de positive og negative standardstop. Der kan opnås højere eller lavere følsomheder ved justering af stopværdierne.

KVALITETSKONTROL

Kvalitetskontrol af C3d Detection er indbygget i testsystemet ved at medtage den positive kontrolperle og positivt og negativt kontrolserum (vedlagt LSA1- og LSA2-kit). Disse kontroller skal medtages i hver testkørsel for at hjælpe med at afgøre, om der er opstået tekniske fejl eller reagensfejl. De positive kontrolsera vil reagere med en del af de LSA-konjugerede perler og danne et mønster, der svarer til det, der findes i C3d detektionskurven. Det negative kontrolserum vil højst reagere med få af de LSA-konjugerede perler. Den C3d-positive kontrolperle bør udvise MFI-værdier ≥ 10.000 med en analyse, der anvender det negative kontrolserum. Prøveværdier, der er lavere end 10.000 MFI kan betyde, at der er tilsat utilstrækkeligt C3dCJ, at analysen er vasket dårligt, eller at C3dCJ er forringet. Perletallet skal være på mindst 40 hændelser.

PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Der kan opstå fejlagtige resultater som følge af bakteriel kontamination af testmaterialer, utilstrækkelige inkubationsperioder, utilstrækkelig vask eller dekantering af perler, udsættelse af C3dCJ for spredt lys eller udeladelse af testreagenser eller proceduretrin.

Tilstedeværelsen af immunkomplekser eller andre immunglobulinagregater i seraprøven kan medføre en forhøjet uspecifik binding og danne fejlagtige resultater i analysen.

Serumantistoftiter er prøve- og tidsspecifik. Hvis mange perler producerer MFI-værdier over 15.000, kan det være nødvendigt at fortynde sera.

På grund af HLA-testens komplicerede beskaffenhed og de mange faktorer, der kan påvirke den komplementkaskade, der fører til dannelse af C3d, skal kvalificeret personale gennemgå og fortolke resultaterne. Brugen af andre kontrolsera og stopværdier end dem, der er anført i analyseattesten, er ikke blevet valideret.

Denne test bør ikke anvendes som den eneste kilde for kliniske beslutninger.

FEJLFINDING

(Se også indlægssedlerne til LIFECODES LSA klasse I og klasse II, LC976CE).

PROBLEM	MULIG ÅRSAG	LØSNING
Lav perlemåling for C3dPCB, kun	Utilstrækkelig mængde perler tilsat LSA perleblending	Pulsér vortexmixer for at opslæmme helt igen, undgå pipettering <3 µl, brug kalibrerede pipetter
	Instrumentfejl – forkert kalibrering	Se Luminex-manualen
	Lysblegede perler	Brug nye hætteglas med C3dPCB
C3d MFI-værdier med positiv kontrol med serum <10,000 MFI	Lysblegede eller utilstrækkelig mængde C3dCJ tilsat reaktionen	Gentag analysen. Brug nye hætteglas med C3dCJ
	Dårlig vask	Gentag analysen og monitorér vaskene
Lav MFI for positive kontrolserum	Forkert prøve tilsat	Gentag analysen med korrekt kontrolprøve
	Utilstrækkelig mængde C3dCJ tilsat reaktionen	Gentag analysen med korrekte mængde C3dCJ
	Utilstrækkelig mængde C3dCS, eller det blev ikke tilsat reaktionen	Gentag analysen med tilsat C3dCS
	Lav analysetemperatur	Kontroller, at analysen udføres ved 20 °C-24 °C. Prøv den højere ende af temperaturområdet for en højere MFI.
Afvigende mønster for positive kontrolsera	Forkert prøve tilsat	Gentag analysen med korrekt kontrolprøve
	Dårlig vask	Gentag analysen og overvåg vaskene
Højt MFI for negative kontrolsera (>1500 MFI)	Dårlig vask	Gentag analysen og overvåg vaskene for at sikre, at perlerne genopslæmmes under vask
		Reducér vakuumtrykket

SPECIFIKKE PERFORMANCEEGENSKABER

Når LIFECODES C3d Detection anvendes i overensstemmelse med den beskrevne procedure, afslører resultaterne tilstedeværelse eller fravær af komplement bundet til antistof-/antigenkomplekset.

En sammenlignende undersøgelse med 142 prøver blev udført mellem LIFECODES C3d Detection og komplementafhængig cytotoksitet (CDC). Følsomheden for LIFECODES C3d Detection var bedre for denne gruppe prøver end CDC-testen til detektion af komplementbindende HLA-antistof i positive serumprøver, som målt i analyserne for LIFECODES LSA klasse I og klasse II.

LITTERATURHENVISNINGER

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(3): S15-S20.
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.

PRODUCENT OG AUTORISERET REPRÆSENTANT

Producent: Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 USA.

Tlf.: +1-203-328-9500, +1-888-329-0255 Fax: +1-203-328-9599

Autoriseret forhandler: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322, Tyskland

Tlf.: (+49) 6074-84 20 -0, Fax: (+49) 6074-84 20-99



Europæisk teknisk service: +32/3 385 47 91

Udgivet: Rev 0, 2015-08-21