

La documentación del producto y las traducciones están disponibles en: WWW.IMMUCOR.COM

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

Detección del C3d de LIFECODES®

Para utilizarse en diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos.....	1	Recogida y preparación de muestras.....	3
Uso previsto.....	1	Instrucciones de uso.....	3
Resumen y explicación.....	1	Resultados.....	4
Principios del procedimiento.....	1	Control de calidad.....	4
Reactivos suministrados.....	2	Limitaciones del procedimiento.....	5
A. Identificación y condiciones de almacenamiento.....	2	Resolución de problemas.....	5
B. Advertencias o precauciones.....	2	Características específicas del rendimiento.....	5
C. Purificación o tratamiento para el uso..	2	Referencias	6
D. Indicaciones de inestabilidad.....	2	Fabricante y representante autorizado....	6
Materiales necesarios pero no suministrados.....	2		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas de los productos y documentos complementarios)

Código del lote		Número de catálogo		Fecha límite de uso		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Fabricante		Sensible a la luz (Mantenga alejado de la luz)		Temperatura (almacenamiento)		Cantidad suficiente para N pruebas	
Representante autorizado en la Comunidad Europea		Advertencia					

USO PREVISTO

El kit de detección del C3d LIFECODES® es un equipo de análisis cualitativo para detectar el complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos del suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Este producto se ha diseñado para detectar el complemento C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos. Este producto contiene el anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE, microesferas de control positivo y un complemento con sueros humanos y un tampón de lavado.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Una parte alícuota de los antígenos HLA vinculados a las microesferas se deja incubar con un pequeño volumen de muestra de suero de prueba. Después de esta incubación inicial, se agrega un reactivo de suero negativo como fuente de complemento para una incubación adicional. Las microesferas sensibilizadas se lavan posteriormente para quitar el anticuerpo no vinculado. Se agrega después un anticuerpo contra el C3d humano conjugado con ficoeritrina. Después de otra incubación, se lava la muestra de prueba, se diluye y se

analiza con el instrumento Luminex. La intensidad de la señal de cada microesfera de la muestra de prueba se compara con la intensidad de la señal de los sueros de control negativo con el fin de determinar si la muestra se considera positiva o negativa para el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

A. Identificación y condiciones de almacenamiento

Número del producto de detección del C3d: 265400

1. **C3dCJ** Conjugado del C3d (número de pieza: 265410; 1200 µL). Anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE en un tapón de almacenamiento de base fosfatada, listo para utilizarse, que contiene NaCl, Tween-20 y azida de sodio. SENSIBLE A LA LUZ. Mantenga alejado de la luz directa durante períodos prolongados. **Almacene a 2 - 8 °C en la oscuridad hasta 3 meses o a ≤-65 °C hasta la fecha de caducidad.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces a ≤-65 °C después de la descongelación inicial.
2. **C3dCS** Suero de complemento (número de pieza: 265415; 2 frascos de 360 µL). Suero de donante varón al que no se ha realizado transfusión. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 4 veces después de la descongelación inicial.
3. **C3dPCB** Microesfera de control positivo del C3d (número de pieza: 265405; 24 µL). El tapón de almacenamiento es de base fosfatada y contiene NaCl, Tween-20, azida de sodio y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces después de la descongelación inicial.
4. **LMWB** Tapón de lavado (número de pieza: 628221; 30 mL). Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. **Consérvelo a 2-8°C** y equilíbrelo con la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de usarlo.

B. Advertencias o precauciones

1. Para utilizarse en diagnóstico *in vitro*
2. El material de origen humano usado para producir este kit se ha sometido a pruebas y los resultados son negativos para anticuerpos del VIH, VHC y HBsAg según los métodos aprobados por la Dirección de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer la certeza absoluta de que no hay agentes infecciosos. Por tanto, **siga las «precauciones universales»** cuando trabaje con estos materiales.
3. Los reactivos contienen un 0,1 % de azida de sodio como agente conservante, que puede reaccionar con los elementos de fontanería de plomo y cobre para formar azidas metálicas explosivas. Utilice grandes cantidades de agua cuando deseche materiales por un fregadero.
4. La contaminación bacteriana de las muestras o la existencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina pueden causar un aumento de los vínculos no específicos y generar resultados erróneos.
5. Después de utilizarlos, deseche todos los materiales según las normativas locales.
6. Consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales para obtener información adicional.
7. En los sueros de complemento almacenados a 2 - 8 °C durante períodos largos se ha observado que la actividad del complemento se reduce.
8. Las microesferas y el conjugado son SENSIBLES A LA LUZ. La exposición a la luz que exijan las actividades rutinarias se limitará a un máximo de tres horas.

C. Purificación o tratamiento necesario para el uso

1. Véase "Recogida y preparación de muestras".
2. Todos los componentes están listos para su uso y no se requiere ninguna dilución.

D. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbidos o cuya fecha de caducidad haya vencido.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS necesarios pero NO SUMINISTRADOS

- Kits LIFECODES LSA clase I (número de pieza: 265100, LSA1) o LIFECODES LSA clase II (número de pieza: 265200, LSA2).
- Equipo necesario para realizar los análisis LIFECODES LSA clase I o clase II de (véase el folleto informativo correspondiente, LC1683CEES).

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DEL SUERO

Se debe recoger sangre sin anticoagulante, utilizando una técnica aséptica, y se debe someter a las pruebas mientras esté reciente o se debe almacenar apropiadamente con el fin de reducir al máximo la posibilidad de reacciones de falsos positivos o de falsos negativos debidas a un almacenamiento inadecuado o a la contaminación de la muestra. El suero debe almacenarse a 2 - 8 °C hasta un máximo de 48 horas. Si el suero ha de almacenarse durante más de 48 horas, debe congelarse a -20 °C o menos, o a -80 °C si se ha de conservar hasta 2 años. Los laboratorios individuales deben establecer y validar métodos para almacenar sueros durante más de 2 años. El suero debe separarse de los glóbulos rojas cuando se almacena o transporta. Evite congelar y descongelar de manera repetida las muestras de suero.

PRECAUCIÓN: No utilice sueros contaminados microbiológicamente, hemolizados o lipémicos, ya que estos pueden producir resultados incoherentes.

Antes de los análisis, se deben agitar brevemente en vórtice y centrifugar todas las muestras (30 segundos a ≈10 000xg) para sedimentar cualquier material particulado que pueda estar presente.

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se **DEBE** tener cuidado para evitar la contaminación del tapón de lavado y del reactivo contra el C3d humano. La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano puede producir posteriormente un error en la prueba.
- Una muestra de sueros de control positivo y negativo se debe incluir con cada prueba con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo.
- El suero de complemento es un reactivo de suero negativo necesario para el análisis de detección del C3d como fuente estándar de complemento.
- Además, siga las precauciones generales descritas en el folleto informativo del producto LIFECODES LSA (LC1683CEES).

1. Encienda el instrumento Luminex con el fin de permitir un calentamiento de 30 minutos.
2. Retire la mezcla de microesferas LSA, la microesfera de control positivo del C3d (C3dPCB), el suero de complemento del C3d (C3dCS) y el conjugado del C3d (C3dCJ) del congelador de -65 °C y almacene en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se descongelen. Después de descongelar, coloque inmediatamente en hielo y proteja de la luz.
3. Permita que el tapón de lavado alcance la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de utilizarse. En este período, utilice la hoja de formato de la placa (LC979) para asignar una posición en placa para cada suero y para los controles que se analizarán. **Los sueros de control negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2) se usan como control negativo.**
4. Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtros con una cubierta plástica adhesiva. Humedezca previamente los pocillos que se utilizarán con 100-300 µL de agua destilada. Después de 2-5 minutos, quite el agua mediante una aspiración delicada utilizando un colector de vacío. (Véanse las recomendaciones del fabricante para conocer el uso adecuado.)
5. Prepare las microesferas LSA centrifugando el frasco brevemente (30 segundos) a ≈600 – 800 x g con el fin de retirar cualquier microesfera o líquido de la tapa o paredes del frasco. Agite en vórtice por completo (≈1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme. En otro frasco combine 1 µL/muestra de C3dPCB con el volumen apropiado de microesferas LSA (40 µL/muestra). Agite en vórtice por completo (≈1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme.
6. Agregue 40 µL de la mezcla de microesferas LSA con C3dPCB a cada pocillo asignado. Agite en vórtice el frasco de microesferas LSA cada 2 minutos para mantener las microesferas en suspensión a la vez que estas se distribuyen. Centrifugue el suero (30 segundos a ≈10,000 x g) y agregue 10 µL de suero o suero de control y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas nuevamente suspendidas para garantizar que se distribuyen suficientes microesferas en los pocillos y lograr unos períodos reducidos de recuento de microesferas. Si no se agitan en vórtice las microesferas de manera intermitente, esto hará que las microesferas se asienten en la parte inferior del tubo. De esta manera, se dispensarían las microesferas en cantidades diferenciales en pocillos, lo que podría afectar de manera adversa a los tiempos de ejecución y al análisis de los resultados.

7. Cubra la placa con una cubierta plástica adhesiva y a continuación coloque láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) en la oscuridad en una plataforma giratoria (200 rotaciones por minuto). Vuelva a colocar las partes no usadas de los sueros de control en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro. Vuelva a colocar las partes no usadas de la mezcla de microesferas LSA y C3dPCB en el lugar de almacenamiento a una temperatura de ≤-65 °C en la oscuridad para uso futuro.
8. Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 30 µL de C3dCS a cada pocillo incluyendo el de control negativo. Vuelva a colocar **el C3dCS en el lugar de almacenamiento a ≤-65°C inmediatamente después del uso.** Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una

plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5-10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 – 24 °C).

- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.

PRECAUCIÓN: Si se usa una fuerza de aspiración excesiva, esto hará que las microesferas se adhieran a la membrana y producirá un fallo de la muestra. Aplique la presión mínima de vacío necesaria para aspirar las muestras.

- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo, aspire y repita tres veces más.

PRECAUCIÓN: Si no se lava por completo, se puede reducir la capacidad del conjugado de detectar el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos y los resultados producidos pueden ser falsos negativos.

- Centrifugue el C3dCJ durante 30 segundos en una microcentrifugadora (≈600 – 800 x g). El C3dCJ está listo para su uso y no se necesita ninguna dilución. Agregue 50 µL de C3dCJ a cada pocillo. Almacene el C3dCJ restante a 4 °C durante un máximo de tres meses o almacénelo a ≤-65°C hasta la fecha de caducidad.
- Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5 - 10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 24°C).
- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.
- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo y aspire.
- Utilice una punta de pipeta limpia, agregue 200 µL de tapón de lavado en cada pocillo y mezcle para volver a suspender las microesferas.
- Recabe los datos con el instrumento Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante **y utilice una plantilla de C3d de Luminex (consulte la documentación de LIFECODES LSA para conocer información específica del lote)**. Los retrasos mayores a 3 horas a temperatura ambiente pueden aumentar la posibilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos. Vuelva a colocar las partes no usadas del tapón de lavado en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro.

RESULTADOS

Detección del C3d: Para analizar los resultados de un lote de muestras:

- Cree una hoja de cálculo en Excel abriendo una copia del archivo de resultados en formato CSV con los resultados del lote de Luminex y "Guarde como" archivo de Excel. Se utilizará este archivo para los cálculos necesarios para analizar los resultados.
- Copie, de la hoja de cálculo de registro específica para el lote incluida en el kit LSA, el nombre del antígeno que corresponde a cada microesfera.
- Después, reste los valores la MFI del suero de control negativo (MFI del suero de control negativo) de la MFI no procesada para cada microesfera individual con el fin de calcular la MFI ajustada al contexto.

(a) MFI ajustada al contexto = MFI de una muestra – MFI del suero de control negativo

- A continuación, divida la MFI ajustada al contexto entre la MFI del control calculada (CalcCON) de su lugar respectivo para generar la proporción corregida para el contexto (BCR-Neg). El CalcCON de cada lugar es el valor de la MFI no procesada de la microesfera con el antígeno de menor categoría de ese lugar.

(b) BCR-Neg = $\frac{\text{MFI ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El menor valor de MFI no procesada del lugar}}$

- Por último, divida la MFI ajustada al contexto del antígeno entre el valor correspondiente de la MFI del antígeno para el suero de control negativo LSA (NC) con el fin de generar la fuerza relativa (fuerza R).

(c) Fuerza R= $\frac{\text{MFI ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El valor de la MFI no procesada del antígeno}}$

Se considera positiva una microesfera si dos o más de los valores ajustados están por encima de los valores límite. Consulte el certificado de análisis del producto de detección del C3d (265400) para conocer los límites predeterminados positivos y negativos. Al ajustar estos límites se pueden obtener sensibilidades mayores o menores.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de la detección del C3d está incorporado en el sistema de pruebas gracias a la inclusión de la microesfera de control positivo y del suero de control positivo y negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2). Estos controles deben incluirse en cada

análisis con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo. El suero de control positivo reaccionará con una serie de microesferas conjugadas LSA para generar un patrón similar al del gráfico de detección del C3d. El suero de control negativo reaccionará con solo unas pocas microesferas conjugadas LSA, e incluso podría no reaccionar. La microesfera de control positivo del C3d debería generar valores de la MFI $\geq 10\ 000$, con un análisis en que se utilice el suero de control negativo. Los valores de muestras menores que 10 000 pueden indicar que no se ha agregado suficiente cantidad de C3dCJ, que se ha lavado deficientemente el material de análisis o que la calidad de C3dCJ se ha visto afectada. El recuento de microesferas debería ser de por lo menos 40 reacciones.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden darse resultados erróneos por la contaminación bacteriana de los materiales de pruebas, períodos inadecuados de incubación, el lavado inapropiado o la decantación de microesferas, la exposición de C3dCJ a luz dispersa o la omisión de reactivos o pasos en los análisis.

La presencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina en la muestra de sueros puede producir un aumento de vínculos no específicos y generar resultados erróneos de este análisis.

Los valores de los anticuerpos de los sueros son específicos de períodos y muestras. Si muchas microesferas producen valores de la MFI mayores que 15 000, podría ser necesario diluir los sueros.

Debido a la naturaleza compleja de las pruebas de los HLA y a los diversos factores que podrían afectar la cascada de complementos que conduce a la formación del C3d, los resultados se deben revisar e interpretar por parte de personas capacitadas. El uso de cualquier suero de control y de valores límite diferentes a aquellos suministrados en el certificado de análisis no ha sido validado.

Esta prueba no puede usarse como la única base para las decisiones clínicas.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

(Consulte también el folleto informativo de los productos LSA clase I y clase II de LIFECODES, LC1683CEES).

PROBLEMA	CAUSA POSIBLE	SOLUCIÓN
Bajo recuento de microesferas, solo para C3dPCB	No se agregaron suficientes microesferas a la mezcla de microesferas LSA	Vuelva a suspender completamente generando un vórtice breve, evite las pipetas de <3 μ L. Utilice pipetas calibradas.
	Fallos del instrumento - no se calibra correctamente	Vea el manual de Luminex
	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un frasco nuevo de C3dPCB
Valores de la MFI de control positivo del C3d con suero <10 000	Se agregó C3dCJ fotoblanqueado o insuficiente a la reacción	Repita el análisis. Utilice un frasco nuevo de C3dCJ
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
Baja MFI para el suero de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	No se agregó suficiente C3dCJ a la reacción.	Repita el análisis con la cantidad correcta de C3dCJ.
	No se agregó suficiente C3dCS o no se agregó ningún C3dCS a la reacción.	Repita el análisis agregando C3dCS.
	Baja temperatura de análisis	Confirme que el análisis se realiza a 20°C-24°C. Intente realizarlo en el límite superior de temperatura para lograr una MFI mayor.
Patrón anómalo para los sueros de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
MFI alta para los sueros de control negativo (>1500)	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados para garantizar que las microesferas se vuelven a suspender durante el lavado.
		Disminuya la potencia de aspiración.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

Cuando se utiliza el equipo de detección del C3d de LIFECODES según el procedimiento descrito anteriormente, los resultados revelan la presencia o ausencia del complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

Se realizó un estudio utilizando 142 muestras que comparaba la detección de C3d de LIFECODES y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC por sus siglas en inglés). Para este juego de muestras, la sensibilidad de la detección del C3d de LIFECODES era

mejor que la de la prueba de CDC para la detección del complemento de vínculo del anticuerpo HLA en muestras de suero positivo, según se desprende de los análisis LSA de las clases I y II de LIFECODES.

REFERENCIAS

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. y 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. Wahrmann, 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. Gieriej, 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.

REPRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Strasse 32, 63303 Dreieich, Germany

Servicio Técnico Europeo: +32/3 385 47 91

Emitido: 2017-02-23

