

FICHE DE PRODUIT

LIFECODES® C3d Detection




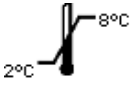






Destiné au diagnostic in vitro

TABLE DES MATIÈRES

<p>Définition des symboles..... 1</p> <p>Domaines d'utilisation..... 1</p> <p>Résumé et explication..... 1</p> <p>Principes de la méthode..... 1</p> <p>Réactifs fournis..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">A. Identification et conditions de conservation..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">B. Mises en garde ou précautions..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">C. Purification ou traitement pour l'utilisation..... 2</p> <p style="padding-left: 20px;">D. Indications d'instabilité..... 2</p>	<p>Matériels requis mais non fournis..... 2</p> <p>Prélèvement et préparation des échantillons..... 2</p> <p>Instructions d'emploi..... 3</p> <p>Résultats..... 4</p> <p>Contrôle de qualité..... 4</p> <p>Limites de la procédure..... 5</p> <p>Résolution des problèmes..... 5</p> <p>Caractéristiques de performances spécifiques..... 5</p> <p>Références..... 5</p> <p>Fabricant et représentant autorisé..... 6</p>
---	---

DÉFINITION DES SYMBOLES

(Étiquettes des produits et documents annexes)

Numéro de lot 	Numéro catalogue 	À utiliser avant 	Plage de températures (stockage) 
Fabricant 	Photosensible (Tenir à l'abri de la lumière) 	Température (stockage) 	Suffisant pour N analyses 
Représentant autorisé dans la Communauté européenne 	Mise en garde 		

DOMAINES D'UTILISATION

LIFECODES® C3d Detection est un test qualitatif détectant le complément lié à un complexe anticorps/antigène dans le sérum humain.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Ce produit est conçu pour détecter le complément C3d lié à un complexe anticorps/antigène. Ce produit contient un anticorps anti-C3d humain conjugué à la PE, une bille de témoin positif, des sérums humains contenant du complément et du tampon de lavage.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Une aliquote d'antigènes HLA liés à des billes est laissée incuber avec un petit volume de l'échantillon de sérum à analyser. Après cette incubation initiale, du réactif sérum négatif est ajouté comme une source de complément pour une incubation supplémentaire. Les billes sensibilisées sont ensuite lavées pour éliminer l'anticorps non lié. Un anticorps anti-C3d humain conjugué à la phycoérythrine est ajouté ensuite. Après une nouvelle incubation, l'échantillon à tester est lavé, dilué et analysé sur l'appareil Luminex. L'intensité du signal de chaque bille, pour l'échantillon à tester, est comparée à l'intensité du signal des sérums témoins négatifs pour déterminer si l'échantillon doit être considéré comme positif ou négatif pour C3d lié au complexe anticorps/antigène.

RÉACTIFS FOURNIS

A. Identification et conditions de conservation Numéro de produit C3d Detection 265400

1. **C3dCJ** Conjugué C3d (P/N 265410 ; 1 200 µL). Anticorps anti-C3d humain conjugué à PE dans un tampon de conservation à base de phosphate prêt à l'emploi contenant du NaCl, du Tween-20 et de l'azoture de sodium. **PHOTOSENSIBLE**. Éviter l'exposition prolongée à la lumière directe. **Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C à l'obscurité pendant une durée allant jusqu'à 3 mois ou à ≤ -65 °C jusqu'à la date de péremption**. Il peut être recongelé jusqu'à 6 fois à ≤ -65 °C après la décongélation initiale.
2. **C3dCS** Sérum complémenté (P/N 265415 ; 2 flacons x 360 µL). Sérum de donneur de sexe masculin non transfusé. **Conserver à ≤ -65 °C**. Il peut être recongelé jusqu'à 4 fois après la décongélation initiale.
3. **C3dPCB** Bille témoin positif C3d (P/N 265405 ; 24 µL). Le tampon de conservation est un tampon à base de phosphate contenant du NaCl, du Tween-20, de l'azoture de sodium et des protéines bovines. **PHOTOSENSIBLE Conserver à une température ≤ -65°C**. Il peut être recongelé jusqu'à 6 fois après la décongélation initiale.
4. **LSAWB** Tampon de lavage LSA (P/N 265001 ; 25 mL). Un tampon à base de phosphate contenant du NaCl, du Tween-20 et de l'azoture de sodium. **Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C** et équilibrer jusqu'à la température ambiante (20 à 24 °C) avant l'emploi.

B. Mises en garde ou précautions

1. Destiné au diagnostic in vitro
2. Le matériel d'origine humaine utilisé pour la production de ce kit a été testé et s'est avéré négatif pour les anticorps contre le VIH, le VHC et HBsAg par des méthodes approuvées par la FDA. Cependant, aucune méthode de test n'offre de garantie totale quant à l'absence d'agents infectieux. En conséquence, **utiliser les Précautions universelles** pour travailler avec ces matériels.
3. Les réactifs contiennent 0,1 % d'azoture de sodium comme agent de conservation, qui peut réagir avec les canalisations en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques explosifs. Faire couler de grandes quantités d'eau lors de l'élimination des matériels dans un évier.
4. La contamination bactérienne des échantillons ou la présence de complexes immuns ou autres agrégats d'immunoglobulines peuvent provoquer une augmentation de la liaison non spécifique et des résultats erronés.
5. Éliminer tous les matériels après usage, conformément aux dispositions réglementaires locales.
6. Consulter les fiches de données de sécurité pour des informations supplémentaires.
7. Les sérums complémentés laissés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant de longues périodes présentent une baisse de l'activité du complément.
8. Les billes et les conjugués sont SENSIBLES À LA LUMIÈRE. Ne pas dépasser trois heures d'exposition régulière à la lumière.

C. Purification ou traitement nécessaire pour l'utilisation

1. Voir « Prélèvement et préparation des échantillons ».
2. Tous les composants sont prêts à l'emploi et aucune dilution n'est nécessaire.

D. Indications d'instabilité

1. Ne pas utiliser des composants ou des témoins qui sont troubles ou après leur date de péremption.

MATÉRIELS, RÉACTIFS ET ÉQUIPEMENT nécessaires mais NON FOURNIS

- Kits LIFECODES LSA Classe I (P/N 265100, LSA1) ou LIFECODES LSA Classe II (P/N 265200, LSA2).
- Équipement nécessaire pour effectuer l'analyse LIFECODES LSA Classe I ou Classe II (voir la Notice produit correspondante, LC976CE)

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS ET PRÉPARATION DU SÉRUM

Le sang doit être prélevé sans anticoagulant en utilisant une technique aseptique et doit être testé pendant qu'il est encore frais ou conservé de manière appropriée pour minimiser le risque de réactions faussement positives ou faussement négatives dues à un stockage incorrect ou à une contamination de l'échantillon. Le sérum doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant une durée maximale de 48 heures. Si le sérum doit être stocké pendant plus de 48 heures, il doit être congelé à au moins -20 °C ou -80 °C pendant une durée

maximale de 2 ans. Chaque laboratoire doit établir et valider des méthodes pour conserver les sérums pendant plus de 2 ans. Le sérum doit être séparé des globules rouges lorsqu'il est stocké ou expédié. Éviter de congeler et décongeler plusieurs fois les échantillons de sérum.

ATTENTION : ne pas utiliser de sérums microbiologiquement contaminés, hémolysés ou lipémiques car ces échantillons peuvent donner des résultats non cohérents.

Avant d'être analysés, tous les échantillons doivent être vortexés et centrifugés rapidement (30 secondes à ~10 000xg) pour sédimenter les matières particulaires éventuellement présentes.

INSTRUCTIONS D'EMPLOI

PRÉCAUTIONS :

- Il FAUT veiller à éviter toute contamination du tampon de lavage et du réactif anti-C3d humain. La contamination involontaire de ces réactifs par du sérum humain peut entraîner par la suite un échec de l'analyse.
- Des échantillons de sérums témoins positifs et négatifs doivent être intégrés à chaque test pour aider à déterminer si une erreur technique ou des échecs des réactifs sont survenus.
- Le sérum complémenté est un réactif de sérum négatif nécessaire pour l'essai de détection C3d comme source standard de complément.
- Respecter également les précautions générales décrites dans la Notice produit LIFECODES LSA (LC976CE).

1. Mettre l'appareil Luminex sous tension pour permettre un préchauffage de 30 minutes.
2. Retirer le mélange de billes LSA, les billes de témoin positif C3d (C3dPCB), le sérum complémenté C3d (C3dCS) et le conjugué C3d (C3dCJ) du congélateur à -65 °C et les conserver à l'obscurité à température ambiante jusqu'à la décongélation. Une fois décongelés, les placer immédiatement sur de la glace et les protéger de la lumière.
3. Amener le tampon de lavage à la température ambiante (20 à 24 °C) avant l'utilisation. Pendant ce temps, utiliser la feuille au format plaque (LC979) pour attribuer une position sur la plaque à chacun des sérums et des témoins à analyser. **Les sérums témoins négatifs (fournis avec les kits LSA1 et LSA2) sont utilisés comme témoin négatif.**
4. Recouvrir les puits non assignés de la plaque de filtration avec une protection en plastique adhésif. Pré-humidifier les puits à utiliser avec 100 à 300 µL d'eau distillée. Après 2 à 5 minutes, éliminer l'eau par aspiration légère avec le collecteur à vide. (Voir les recommandations du fabricant pour une utilisation appropriée).
5. Préparer les billes LSA en centrifugeant rapidement (30 secondes) le flacon à ~600 – 800 x g pour éliminer les billes ou le liquide du capuchon ou des parois du flacon. Vortexer soigneusement (~1 minute) pour remettre les billes en suspension de manière uniforme. Dans un flacon séparé, combiner 1 µL/échantillon de C3dPCB avec le volume approprié de billes LSA (40 µL/échantillon). Vortexer soigneusement (~1 minute) pour remettre les billes en suspension de manière uniforme.
6. Ajouter 40 µL de mélange de billes LSA avec le C3dPCB à chacun des puits assignés. Vortexer à nouveau le flacon de billes LSA toutes les 2 minutes pour garder les billes en suspension tout en répartissant les billes. Puis centrifuger le sérum (30 secondes à ~10 000 x g) et ajouter 10 µL de sérum ou de sérum témoin et mélanger.

ATTENTION : Il est important de conserver les billes en suspension pour assurer que suffisamment de billes sont aliquotées dans les puits et pour assurer de faible temps de comptage des billes. L'absence de vortexage des billes par intermittence aura pour effet une sédimentation des billes vers le fond du tube. Cela entraînera le dépôt de quantités inégales de billes dans les puits, ce qui peut affecter défavorablement les durées des séries et l'analyse des résultats.

7. Recouvrir la plaque avec la protection en plastique adhésif, puis l'envelopper avec une feuille d'aluminium ou la mettre dans une boîte pour protéger de la lumière. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 24 °C) à l'obscurité sur un agitateur rotatif (200 rotations par minute). Ramener les fractions de sérums témoins non utilisées au stockage à la température de 2 à 8 °C pour une utilisation ultérieure. Ramener les fractions non utilisées de mélange de billes LSA et de C3dPCB au stockage à ≤ -65 °C à l'obscurité pour une utilisation ultérieure.
8. Après l'incubation pendant 30 minutes, retirer la protection en plastique adhésif et ajouter 30 µL de C3dCS à chaque puits, y compris le puits de témoin négatif. Ramener le **C3dCS au stockage à ≤ -65°C immédiatement après l'emploi.** Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium ou la placer dans une boîte pour la protéger de la lumière. Placer sur un agitateur rotatif (réglé à 200 rotations par minute) ou vortexer doucement toutes les 5 à 10 minutes. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 24 °C).
9. Après l'incubation pendant 30 minutes, retirer la protection en plastique adhésif et ajouter 100 µL de tampon de lavage à chaque puits. Mélanger en tapotant le côté de la plaque et aspirer doucement la plaque.

ATTENTION : L'utilisation d'une aspiration trop puissante entraînera l'adhésion des billes à la membrane et un échec de l'échantillon. Appliquer la dépression minimale nécessaire pour aspirer les échantillons.

10. Ajouter 250 µL de tampon de lavage à chaque puits, aspirer et répéter trois fois.

ATTENTION : L'absence de lavage complet peut réduire la capacité du conjugué à détecter le C3d lié au complexe anticorps/antigène et peut entraîner des résultats faussement négatifs.

11. Centrifuger le C3dCJ pendant 30 secondes dans une microcentrifugeuse (~600 – 800 x g). Le C3dCJ est prêt à l'emploi et aucune dilution n'est nécessaire. Ajouter 50 µL de C3dCJ dans chaque puits. Conserver le C3dCJ restant à 4 °C au maximum pendant 3 mois ou le stocker à ≤ -65 °C jusqu'à la date de péremption.
12. Recouvrir la plaque avec une feuille d'aluminium ou la placer dans une boîte pour la protéger de la lumière. Placer sur un agitateur rotatif (réglé à 200 rotations par minute) ou vortexer doucement toutes les 5 à 10 minutes. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 24 °C).
13. Après l'incubation pendant 30 minutes, retirer la protection en plastique adhésif et ajouter 100 µL de tampon de lavage à chaque puits. Mélanger en tapotant le côté de la plaque et aspirer doucement la plaque.
14. Ajouter 250 µL de tampon de lavage à chaque puits, et aspirer.
15. En utilisant un embout de pipette propre, ajouter 200 µL de tampon de lavage à chaque puits et mélanger pour remettre les billes en suspension.
16. Recueillir les résultats avec l'appareil Luminex en respectant les recommandations du fabricant et **utiliser un modèle C3d Luminex (voir LIFECODES LSA pour les informations spécifiques du lot)**. Des délais supérieurs à 3 heures à température ambiante peuvent augmenter le risque d'obtenir des réactions faussement positives ou faussement négatives. Replacer la fraction de tampon de lavage non utilisée à la température de 2 à 8 °C pour une utilisation ultérieure.

RÉSULTATS

Détection de C3d : Pour analyser les résultats pour un lot d'échantillons :

1. Créer une feuille de travail sous Excel en ouvrant une copie du fichier CSV des données de sortie avec les résultats du lot Luminex et « Enregistrer sous » un fichier Excel. Ce fichier sera utilisé pour les calculs servant à analyser les résultats.
2. À partir de la feuille d'enregistrement spécifique du lot fournie avec le kit LSA, copier le nom de l'antigène qui correspond à chaque bille.
3. Ensuite, soustraire les valeurs de l'IFM du sérum témoin négatif (IFM du sérum NC) de l'IFM BRUTE pour chaque bille individuelle pour calculer l'IFM ajustée au bruit de fond (ajustée au BG¹).

(a) IFM ajustée au BG = IFM d'un échantillon – IFM du sérum NC

4. Ensuite, diviser l'IFM ajustée au BG par l'IFM du témoin calculé (CalcCON) de son locus respectif pour produire le rapport corrigé du bruit de fond (BCR-Neg). Le CalcCON pour chaque locus est la valeur de l'IFM brute de la bille d'antigène de plus faible rang pour ce locus.

(b) BCR-Neg = $\frac{\text{IFM ajustée au BG de l'antigène}}{\text{IFM de valeur brute la plus faible du locus}}$

5. Enfin, diviser l'IFM ajustée au BG de l'antigène par la valeur correspondante de l'IFM de l'antigène pour le sérum témoin négatif LSA (NC) pour produire la force relative (force-R).

(c) « force-R » = $\frac{\text{IFM ajustée au BG de l'antigène}}{\text{Valeur brute de l'IFM de l'antigène}}$

Une bille est considérée comme positive si au moins deux des valeurs ajustées sont supérieures aux valeurs de seuil. Consulter le Certificat d'analyse du produit C3d Detection (265400) pour les seuils par défaut positifs et négatifs. Des sensibilités supérieures ou inférieures peuvent être obtenues en ajustant le seuil.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le contrôle de qualité du C3d Detection est intégré dans le système de test par l'inclusion de la bille de témoin positif et des sérums témoins négatifs et positifs fournis avec les kits LSA1 et LSA2). Ces témoins doivent être intégrés à chaque série de tests pour aider à déterminer si des erreurs techniques ou des échecs des réactifs sont survenus. Le sérum témoin positif va réagir avec un certain nombre de billes conjuguées LSA, fournissant un profil similaire à celui obtenu dans le graphe de détection C3d. Le sérum témoin négatif va réagir avec peu de billes conjuguées LSA ou aucune.

La bille de témoin positif C3d doit donner des valeurs de l'IFM ≥ 10 000 avec un essai utilisant le sérum témoin négatif. Les valeurs d'échantillon inférieures à 10 000 IFM peuvent indiquer un ajout insuffisant de C3dCJ, le test peut avoir été insuffisamment lavé ou le C3dCJ peut être dégradé.

Le comptage des billes doit être d'au moins 40 événements.

LIMITES DE LA MÉTHODE

Des résultats erronés peuvent être la conséquence d'une contamination bactérienne des produits de test, de périodes d'incubation inadéquates, d'un lavage ou d'une décantation inadéquats des billes, d'une exposition du C3dCJ à de la lumière parasite ou de l'oubli de réactifs de test ou d'étapes.

La présence de complexes immuns ou autres agrégats d'immunoglobulines dans l'échantillon de sérum peut provoquer une augmentation de la liaison non spécifique et produire des résultats erronés dans ce test.

Les titres d'anticorps sériques sont spécifiques de l'échantillon et du moment de détermination. Si de nombreuses billes produisent des valeurs de l'IFM supérieures à 15 000, il peut être nécessaire de diluer les sérums.

En raison de la complexité du typage HLA et des multiples facteurs pouvant affecter la cascade du complément conduisant à la formation du C3d, les résultats doivent être vérifiés et interprétés par un personnel qualifié. L'utilisation de sérums témoins et de valeurs seuils autres que ceux fournis dans le Certificat d'analyse n'a pas été validée.

Ce test ne doit pas être utilisé comme critère unique de décisions cliniques.

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

(Consulter également la Notice produit de LIFECODES LSA Classe I et Classe II LC976CE).

PROBLÈME	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Faible comptage des billes seulement pour C3dPCB	Ajout insuffisant de billes au mélange de billes LSA	Vortexer par impulsions pour remettre complètement en suspension, éviter de pipeter < 3 µL, utiliser des pipettes calibrées
	Pannes de l'appareil - hors calibrage	Consulter le Manuel du Luminex
	Billes photoblanchies	Utiliser un nouveau flacon de C3dPCB
Valeurs de l'IFM du témoin positif C3d avec le sérum < 10 000 IFM	C3dCJ photoblanchi ou ajouté en quantité insuffisante à la réaction	Recommencer le test. Utiliser un nouveau flacon de C3dCJ
	Lavage insuffisant	Répéter le test et surveiller les lavages
IFM faible pour le sérum témoin positif	Échantillon incorrect ajouté	Répéter le test avec l'échantillon témoin correct
	C3dCJ ajouté en quantité insuffisante à la réaction	Répéter le test avec la quantité correcte de C3dCJ
	C3dCS insuffisant ou n'a pas été ajouté à la réaction	Répéter le test en ajoutant du C3dCS
	Température de test basse	Confirmer que le test est effectué à 20 °C-24 °C. Essayer la température plus élevée de la plage pour une IFM plus élevée.
Anomalie du profil pour les sérums témoins positifs	Échantillon incorrect ajouté	Répéter le test avec l'échantillon témoin correct
	Lavage insuffisant	Répéter le test et surveiller les lavages
IFM élevée pour les sérums témoins négatifs (> 1 500 IFM)	Lavage insuffisant	Répéter le test et surveiller les lavages pour assurer que les billes sont remises en suspension pendant le lavage
		Réduire la puissance de l'aspiration

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Lorsque le LIFECODES C3d Detection est utilisé conformément à la procédure décrite ci-dessus, les résultats révèlent la présence ou l'absence de complément lié au complexe anticorps/antigène.

Une étude comparative utilisant 142 échantillons a été réalisée entre le LIFECODES C3d Detection et la Cytotoxicité dépendante du complément (CDC). Pour cette série d'échantillons, la sensibilité du LIFECODES C3d Detection était supérieure au test CDC pour la détection de l'anticorps HLA liant le complément dans les échantillons de sérum positif mesurée par les tests LIFECODES LSA Classe I et Classe II.

RÉFÉRENCES

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. 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. Giej, 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.

FABRICANT ET REPRÉSENTANT AUTORISÉ

Fabricant : Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 ; États-Unis. Téléphone : +1-203-328-9500, 888-329-0255 (aux États-Unis et le Canada) ; Télécopie : +1-203-328-9599

Représentant autorisé : Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322, Allemagne
Téléphone : (+49) 6074-84 20 -0, Télécopie : (+49) 6074-84 20-99

Service technique pour l'Europe : +32/3 385 47 91

Publié : Rév. 0, 2015-08-21

