

La documentazione del prodotto e le traduzioni sono disponibili su: [WWW.IMMUCOR.COM](http://WWW.IMMUCOR.COM)

## FOGLIO ILLUSTRATIVO




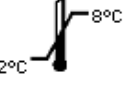






### LIFECODES® C3d Detection

Per uso diagnostico *in vitro*.

INDICE	
Definizione dei simboli.....	1
Impiego previsto.....	1
Riepilogo e descrizione.....	1
Principi della procedura.....	1
Reagenti forniti.....	2
A. Identificazione e condizioni per la conservazione.....	2
B. Avvertenze e precauzioni.....	2
C. Purificazione o trattamento per l'uso..	2
D. Indicazioni di instabilità.....	2
Materiali necessari ma non forniti.....	2
Raccolta e preparazione dei campioni....	2
Istruzioni per l'uso.....	3
Risultati.....	4
Controllo di qualità.....	4
Limiti della procedura.....	4
Risoluzione dei problemi.....	5
Caratteristiche specifiche delle prestazioni.....	5
Riferimenti.....	5
Produttore e rappresentante autorizzato.	6

### DEFINIZIONI DEI SIMBOLI

(Etichette dei prodotti e documentazione integrativa)

Numero di lotto		Numero di catalogo		Data di scadenza		Limiti di temperatura (conservazione)	
Produttore		Fotosensibile (Tenere al riparo dalla luce)		Temperatura (conservazione)		Sufficiente per N test	
Rappresentante autorizzato nell'Unione Europea		Avvertenza					

### IMPIEGO PREVISTO

LIFECODES® C3d Detection è un'analisi qualitativa per la determinazione del legame del complemento al complesso anticorpo/antigene nel siero umano.

### RIEPILOGO E DESCRIZIONE

Il prodotto è stato realizzato per rilevare il legame del complemento C3d al complesso anticorpo/antigene. Questo prodotto contiene anticorpo umano anti-C3d coniugato PE, microsfera di controllo positiva e complemento contenente siero umano e soluzione di lavaggio.

### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Un'aliquota di antigeni HLA legati a microsferi viene fatta incubare con un piccolo volume di campione di siero di controllo. Dopo questa incubazione iniziale, viene aggiunto del siero reagente negativo come sorgente del complemento per un'ulteriore incubazione. Le microsferi sensibilizzate vengono quindi lavate per eliminare gli anticorpi non legati. Vengono poi aggiunti anticorpi umani anti-C3d coniugati alla ficoeritrina. Dopo un'ulteriore incubazione, il campione viene lavato, diluito e analizzato sullo strumento Luminex. L'intensità del segnale proveniente da ciascuna microsfera del campione di prova viene confrontata con l'intensità del segnale di una microsfera di controllo negativa per determinare se il campione deve essere considerato positivo o negativo per il C3d legato al complesso anticorpo/antigene.

## REAGENTI FORNITI

---

### A. identificazione e condizioni per la conservazione

#### Codice prodotto C3d Detection 265400

1. **C3dCJ** C3d coniugato (codice 265410; 1200 µL). Anticorpo umano anti-C3d coniugato PE in una soluzione tampone fosfato pronta all'uso contenente NaCl, Tween-20 e azotidrato di sodio. FOTOSENSIBILE. Non esporre alla luce diretta per lunghi periodi di tempo. **Conservare a 2 - 8 °C al buio fino a 3 mesi o a ≤-65 °C fino alla data di scadenza.** Dopo lo scongelamento iniziale può essere ricongelato fino a 6 volte a ≤-65 °C.
2. **C3dCS** Siero del complemento (codice 265415 ; 2 fiale da 360 µL). Siero da donatore maschio non trasfuso. **Conservare a ≤-65 °C.** Dopo lo scongelamento iniziale può essere ricongelato fino a 4 volte.
3. **C3dPCB** Microsfera di controllo positivo del C3d (codice 265405; 24 µL). La soluzione tampone fosfato contiene NaCl, Tween-20, azotidrato di sodio e proteine bovine. FOTOSENSIBILE. Conservare a ≤ **-65 °C**. Dopo lo scongelamento iniziale può essere ricongelato fino a 6 volte.
4. **LSAWB** Soluzione di lavaggio LSA (codice 265001; 25 mL). Una soluzione tampone fosfato pronta all'uso contenente NaCl, Tween-20 e azotidrato di sodio. **Conservare a 2 - 8°C** e portare alla temperatura ambiente (20-24 °C) prima dell'uso.

### B. Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. Il materiale di origine umana impiegato nella produzione di questo kit è stato testato con metodi approvati dall'FDA ed è riscontrato negativo agli anticorpi HIV, HCV e HbsAg. Tuttavia, nessun metodo analitico può garantire completamente l'assenza di agenti infettivi. Pertanto, quando si lavora con questi materiali **adottare misure di sicurezza universali**.
3. I reagenti contengono, come conservante, lo 0,1% di azotidrato di sodio che può reagire con le tubazioni in piombo e in rame, formando azotidrati metallici esplosivi. Usare grandi quantità di acqua per eliminare i materiali in lavandino.
4. La contaminazione batterica dei campioni o la presenza di immunocomplessi o di altri aggregati immunoglobulinici può provocare un aumento del legame non specifico e causare risultati errati.
5. Dopo l'uso, smaltire tutti i materiali secondo le norme vigenti.
6. Per ulteriori informazioni vedere le schede di sicurezza dei materiali.
7. I sieri del complemento lasciati a lungo a una temperatura di 2 - 8 °C mostrano una ridotta attività del complemento.
8. Le microsfere e il coniugato sono FOTOSENSIBILI. L'esposizione di routine alla luce non deve protrarsi per più di tre ore.

### C. Purificazione o trattamento richiesto per l'uso

1. Vedere "Raccolta e preparazione dei campioni".
2. Tutti i componenti sono pronti per l'uso e non occorre diluirli.

### D. Indicazioni di instabilità

1. Non usare componenti o controlli torbidi o scaduti.

## MATERIALI, REAGENTI E APPARECCHIATURE necessari ma NON FORNITI

---

- Kit LIFECODES LSA Classe I (P/N 265100, LSA1) o LIFECODES LSA Classe II (codice 265200, LSA2).
- Le apparecchiature necessarie per eseguire le analisi LIFECODES LSA Classe I o Classe II (consultare il relativo foglio illustrativo, LC976CE)

## RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DEL SIERO

---

Il sangue va raccolto senza anticoagulanti, utilizzando una tecnica asettica di prelievo, e deve essere analizzato mentre è ancora fresco per ridurre al minimo la possibilità di ottenere reazioni falso-positive o falso-negative imputabili a una conservazione errata o alla contaminazione dei campioni. Il siero deve essere conservato a 2-8 °C per non più di 48 ore. Se si deve conservare per più di 48 ore, congelarlo a una temperatura non superiore a -20 °C o -80 °C per un massimo di 2 anni. Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire e convalidare metodi di conservazione del siero per periodi superiori ai 2 anni. Se il siero viene conservato o trasportato, è necessario separarlo dai globuli rossi. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni di siero.

**ATTENZIONE:** non usare sieri microbiologicamente contaminati, emolizzati o lipemici in quanto campioni di questo tipo possono produrre risultati contraddittori.

Prima di essere analizzati, tutti i campioni devono essere agitati in un Vortex e centrifugati brevemente (30 secondi a ~10.000 g) per corpuscolare il particolato eventualmente presente.

## ISTRUZIONI PER L'USO

### PRECAUZIONI

- EVITARE la contaminazione della soluzione di lavaggio e del reagente C3d anti-umano. La contaminazione involontaria di questi reagenti con il siero umano può causare il fallimento dell'analisi.
- A ogni test si devono aggiungere campioni di siero di controllo positivi e negativi per accertare eventuali errori tecnici o inefficienze dei reagenti.
- Il siero del complemento è un siero reagente negativo necessario come sorgente standard del complemento per la rilevazione del C3d.
- Inoltre, seguire le prescrizioni generali descritte nel foglio illustrativo di LIFECODES LSA (LC976CE).

1. Accendere lo strumento Luminex e farlo scaldare per 30 minuti.
2. Estrarre dal surgelatore a -65 °C la miscela di microsfeere LSA, la microsfera di controllo positivo del C3d (C3dPCB), il siero del complemento del C3d (C3dCS) e il C3d coniugato (C3dCJ) e conservarli al buio a temperatura ambiente finché non si scongelano. Una volta scongelato, collocare immediatamente su ghiaccio e proteggere dalla luce.
3. Portare la soluzione di lavaggio a temperatura ambiente (da 20 a 24 °C) prima dell'uso. Durante questo periodo, usare il foglio di formato piastra (LC979) per assegnare una posizione sulla piastra a ciascuno dei sieri e dei controlli da analizzare. **I sieri di controllo (forniti con i kit LSA1 e LSA2) servono come controllo negativo.**
4. Coprire i pozzetti non assegnati della piastra di filtraggio con coperchi di plastica adesivi. Bagnare preventivamente i pozzetti da usare con 100-300 µL di acqua distillata. Trascorsi 2-5 minuti, rimuovere l'acqua aspirando con delicatezza la piastra con un aspiratore (vedere le istruzioni per l'uso del produttore).
5. Approntare le microsfeere LSA centrifugando per 30 secondi la fiala a 600 – 800 g per rimuovere eventuali microsfeere o liquido dal coperchio o dalle pareti della fiala. Agitare con il Vortex (~ 1 minuto) per sospendere di nuovo le microsfeere in modo uniforme. In una fiala separata combinare 1 µL/campione di C3dPCB con l'idoneo volume di microsfeere LSA (40 µL/campione). Agitare accuratamente con il Vortex (~ 1 minuto) per sospendere di nuovo le microsfeere in modo uniforme.
6. Aggiungere 40 µL di miscela di microsfeere LSA con C3dPCB in ciascuno dei pozzetti assegnati. Agitare al Vortex le fiale con le microsfeere LSA ogni 2 minuti per mantenere le microsfeere in sospensione durante la distribuzione. Quindi centrifugare il siero (30 secondi a ~10.000 g) e aggiungere 10 µL di siero o siero di controllo e miscelare.

**ATTENZIONE:** è importante mantenere le microsfeere in sospensione per garantire che un'aliquota sufficiente di esse sia versata nei pozzetti e assicurare bassi tempi di conteggio. Se non vengono agitate con il Vortex a intervalli regolari, le microsfeere andranno a depositarsi sul fondo della provetta. Di conseguenza, la quantità di microsfeere dispensate nei pozzetti non sarà uniforme, pregiudicando i tempi di esecuzione e l'analisi dei risultati.

7. Coprire la piastra con un coperchio adesivo in plastica e proteggerla dalla luce con un foglio o una scatola. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (da 20 a 24 °C) e al buio su una piattaforma rotante (200 giri al minuto). Riporre le aliquote non utilizzate dei sieri di controllo a 2 - 8 °C per conservarle fino a nuovo uso. Riporre le aliquote non utilizzate di miscela di microsfeere LSA e C3dPCB a ≤-65 °C e conservarle al buio fino a nuovo uso.
8. Dopo 30 minuti di incubazione, rimuovere il coperchio adesivo di plastica e aggiungere 30 µL di C3dCS in ogni pozzetto, incluso il pozzetto di controllo negativo. Riporre **il C3dCS a ≤-65 °C immediatamente dopo l'uso**. Coprire la piastra con un foglio o una scatola per proteggerla dalla luce. Collocarla su una piattaforma rotante (200 giri al minuto) o agitare delicatamente con il Vortex ogni 5-10 minuti. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (da 20 a 24 °C).
9. Dopo 30 minuti di incubazione, rimuovere il coperchio adesivo in plastica e aggiungere 100 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto. Miscelare colpendo leggermente il lato della piastra e aspirare con delicatezza.

**ATTENZIONE:** una forza di aspirazione eccessiva farà aderire le microsfeere alla membrana col rischio di deteriorare il campione. Per aspirare i campioni, applicare la depressione minima necessaria.

10. Aggiungere 250 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto, aspirare e ripetere l'operazione altre tre volte.

**ATTENZIONE:** un lavaggio incompleto può ridurre la capacità del coniugato di rivelare i C3d legati al complesso anticorpo/antigene e causare falsi risultati negativi.

11. Centrifugare il C3dCJ per 30 secondi in una microcentrifuga (~600 – 800 g). Il C3dCJ è pronto per l'uso e non occorre diluirlo. Aggiungere a ogni pozzetto 50 µL di C3dCJ. Conservare il C3dCJ rimanente a 4 °C fino a 3 mesi o a ≤-65°C fino alla data di scadenza.
12. Coprire la piastra con un foglio o una scatola per proteggerla dalla luce. Collocarla su una piattaforma rotante (200 giri al minuto) o agitare delicatamente con il Vortex ogni 5-10 minuti. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (da 20 a 24 °C).
13. Dopo 30 minuti di incubazione, rimuovere il coperchio adesivo in plastica e aggiungere 100 µL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto. Miscelare colpendo leggermente il lato della piastra e aspirare con delicatezza.

14. Aggiungere a ogni pozzetto 250 µL di soluzione di lavaggio e aspirare.
15. Usando un puntale per pipette pulito, aggiungere a ogni pozzetto 200 µL di soluzione di lavaggio e mischiare per rimettere in sospensione le microsfere.
16. Acquisire i dati con lo strumento Luminex rispettando le indicazioni del fabbricante e **usare un modello Luminex C3d (vedere LIFECODES LSA per le informazioni specifiche sul lotto)**. Un ritardo di oltre 3 ore può aumentare la possibilità di ottenere reazioni falso-positive o falso-negative. Riporre l'aliquota non utilizzata di soluzione di lavaggio a 2 - 8 °C e conservarla fino a nuovo uso.

## RISULTATI

---

**Rilevazione del C3d** Per analizzare i risultati di un lotto di campioni, procedere come segue.

1. Creare un foglio di lavoro Excel aprendo una copia del file CSV generato dal Luminex con i risultati del lotto e salvarlo come file Excel. Questo file servirà per i calcoli usati per analizzare i risultati.
2. Dal foglio di lavoro delle registrazioni del lotto fornito con il kit LSA, copiare il nome dell'antigene che corrisponde a ogni microsfera.
3. Quindi sottrarre i valori della MFI del siero di controllo negativo (MFI del siero NC) dalla MFI grezza di ogni singola microsfera per calcolare l'MFI di fondo regolata (BG regolata).

$$(a) \text{ MFI di fondo regolata} = \text{MFI di un campione} - \text{MFI del siero NC}$$

4. Quindi dividere l'MFI di fondo regolata per l'MFI del controllo calcolato (CalcCON) del rispettivo locus per generare il rapporto corretto di fondo (BCR-Neg). Il CalcCON di ogni locus è dato dal valore della MFI grezza della microsfera di antigene con il rango più basso di tale locus.

$$(b) \text{ BCR-Neg} = \frac{\text{MFI di fondo regolata dell'antigene}}{\text{Valore più basso della MFI grezza del locus}}$$

5. Infine, dividere la MFI di fondo regolata dell'antigene per il corrispondente valore della MFI dell'antigene del siero di controllo negativo (NC) LSA per generare la forza relativa (R-Strength).

$$(c) \text{ R-Strength} = \frac{\text{MFI di fondo regolata dell'antigene}}{\text{Valore grezzo della MFI dell'antigene}}$$

Una microsfera viene considerata positiva se due o più dei valori compensati sono superiori ai valori di cutoff. Per i valori predefiniti positivi e negativi del cutoff consultare il certificato di analisi del prodotto di rilevazione del C3d (265400). È possibile ottenere sensibilità maggiori o minori regolando il valore del cutoff.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

---

Il controllo di qualità della rilevazione del C3d è integrato nel sistema di prova mediante l'inclusione dei sieri di controllo positivi e negativi (forniti con i kit LSA1 e LSA2). Tali controlli devono essere inclusi in ogni test eseguito per escludere errori tecnici o deterioramenti dei reagenti. Il siero di controllo positivo reagisce con molte microsfere coniugate LSA producendo uno schema simile a quello nel grafico di rilevazione del C3d. Il siero di controllo negativo reagisce con poche o nessuna delle microsfere coniugate LSA.

La microsfera di controllo positiva del C3d deve generare valori della MFI  $\geq 10.000$  in un'analisi con siero di controllo negativo. Valori della MFI minori di 10.000 nei campioni indicano che non è stata aggiunta una quantità sufficiente di C3dCJ, che il lavaggio potrebbe essere stato insufficiente o che il C3dCJ potrebbe essersi deteriorato.

Il conteggio delle sfere deve essere eseguito su almeno 40 eventi.

## LIMITI DELLA PROCEDURA

---

Risultati errati possono essere causati da contaminazione batterica del materiale di analisi, periodi di incubazione inadeguati, errori di lavaggio o di decantazione delle microsfere, esposizione del C3dCJ alla luce diretta, oppure omissione di reagenti o fasi dell'analisi.

La presenza di immunocomplessi o di altri aggregati immunoglobulinici nel campione di siero può causare un aumento del legame aspecifico e produrre risultati errati.

Il titolo di anticorpi nel siero dipende dal campione e dal tempo. Se per molte microsfere risultano valori della MFI maggiori di 15.000, può essere necessario diluire il siero.

A causa della natura complessa del test HLA e dei diversi fattori che possono influire sulla cascata complementare che porta alla formazione del C3d, l'interpretazione dei dati deve essere affidata a personale qualificato. L'uso di sieri di controllo e valori di cutoff diversi da quelli forniti nel certificato di analisi non è stato convalidato.

Il test non deve essere usato come l'unico fattore in base al quale prendere decisioni cliniche.

## RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

(consultare anche il foglio illustrativo di LC976CE LIFECODES LSA Classe I e Classe II).

PROBLEMA	POSSIBILE CAUSA	SOLUZIONE
Basso numero di microsfere solo per C3dPCB	Poche microsfere aggiunte alla miscela di microsfere LSA	Azionare il Vortex per rimetterle completamente in sospensione, non pipettare <3 µL, usare pipette calibrate.
	Strumentazione guasta - fuori taratura	Consultare il manuale del Luminex
	Microsfere fotoscolorite	Usare una nuova fiala di C3dPCB
Valori della MFI con siero di controllo positivo del C3d <10.000	Il C3dCJ aggiunto alla reazione è fotoscolorito o insufficiente	Ripetere l'analisi Usare una nuova fiala di C3dCJ
	Lavaggio insufficiente	Ripetere l'analisi e controllare i lavaggi.
Bassi valori della MFI per siero di controllo positivo	Aggiunta di un campione non corretto	Ripetere l'analisi con il campione di controllo corretto.
	Il C3dCJ aggiunto alla reazione è insufficiente	Ripetere l'analisi con la quantità corretta di C3dCJ
	C3dCS insufficiente o non aggiunto alla reazione	Ripetere l'analisi aggiungendo C3dCS
	Analisi condotta a bassa temperatura	Accertarsi che l'analisi sia stata eseguita a 20 - 24 °C. Per ottenere valori maggiori della MFI provare all'estremo superiore dell'intervallo di temperature.
Schema anomalo per sieri di controllo positivi.	Aggiunta di un campione non corretto	Ripetere l'analisi con il campione di controllo corretto.
	Lavaggio insufficiente	Ripetere l'analisi e controllare i lavaggi.
Elevati valori della MFI per sieri di controllo negativi (MFI >1500)	Lavaggio insufficiente	Ripetere l'analisi e controllare i lavaggi per accertarsi che le microsfere tornino in sospensione durante il lavaggio.
		Ridurre l'intensità dell'aspirazione.

## CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PRESTAZIONI

Quando LIFECODES C3d Detection viene usato conformemente alla procedura sopra descritta, i risultati rivelano la presenza o l'assenza del legame del complemento al complesso anticorpo/antigene.

È stato condotto uno studio comparativo su 142 campioni tra LIFECODES C3d Detection e il test di citotossicità complemento-dipendente (CDC). In questo gruppo di campioni, la sensibilità di HLS di LIFECODES C3d Detection per la rilevazione di anticorpi HLA che si legano al complemento in campioni di siero positivo misurata mediante LIFECODES LSA Classe I e Classe II è risultata migliore di quella del test CDC.

## RIFERIMENTI

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. Giej, B.; Górnicka, B.; Wasutyński, 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.

## **PRODUTTORE E RAPPRESENTANTE AUTORIZZATO**

---

**Produttore:** Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 USA. Telefono: +1 203-328-9500,  
+1 888-329-0255 Fax: +1 203-328-9599

**Rappresentante autorizzato:** Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322, Germania  
Telefono: +49 6074-84 20 -0 Fax: +49 6074-84 20-99

**Assistenza tecnica in Europa:** +32/3 385 47 91

**Versione:** Rev 0, 21-08-2015

