

Os Documentos e as Traduções deste produto estão disponível em: WWW.IMMUCOR.COM

FOLHETO INFORMATIVO

LIFECODES® Deteção C3d

Para utilização em diagnósticos In Vitro.

TABELA DE CONTEÚDOS

Definições dos Símbolos.....	1	Materiais Necessários,	
Utilização Prevista.....	1	mas não Fornecidos.....	2
Sumário e Explicação.....	1	Recolha e Preparação do Espécime.....	2
Princípios do Procedimento.....	1	Instruções de Utilização.....	3
Reagentes Fornecidos.....	2	Resultados.....	4
A. Identificação e condições		Controlo de Qualidade.....	4
de armazenamento.....	2	Limitações do Procedimento.....	5
B. Avisos ou Precauções.....	2	Resolução de Problemas.....	5
C. Purificação ou Tratamento		Características de Desempenho	
para a Utilização.....	2	Específicas	5
D. Indicações de Instabilidade.....	2	Referências.....	6
		Fabricante e Representante Autorizado... 	6

DEFINIÇÃO DOS SÍMBOLOS

(Etiquetas de Produto e Documentos Adicionais)

Código do Lote



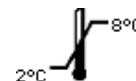
Número de Catálogo



Data de Validade



Gama de Temperaturas (de armazenamento)



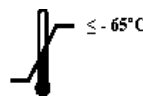
Fabricante



Sensível à Luz (Não expor à luz)



Temperatura (de armazenamento)



Suficiente para N testes



Representante Autorizado na Comunidade Europeia



Aviso



UTILIZAÇÃO PREVISTA

A Deteção C3d da LIFECODES® é um ensaio qualitativo para detetar complementos ligados ao complexo anticorpos/antigénios no soro sanguíneo humano.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

Este produto foi concebido para detetar o complemento C3d ligado ao complexo anticorpos/antigénios.

Este produto contém o anticorpo C3d anti-humano conjugado com ficoeritrinas, microesferas de controlo positivo, complemento com soro sanguíneo humano e tampão de lavagem.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Uma alíquota de antigénios HLA ligados a microesferas fica a ser incubada com um pequeno volume de uma amostra de teste de soro sanguíneo. Depois desta incubação inicial, o reagente de soro sanguíneo negativo é adicionado, como fonte de complemento para uma incubação adicional. As microesferas sensibilizadas são depois lavadas para remover os anticorpos não ligados. É depois adicionado um anticorpo C3d anti-humano conjugado com ficoeritrina. Após uma incubação adicional, a amostra de ensaio é lavada, diluída e analisada no instrumento Luminex. A intensidade do sinal de cada microesfera, para a amostra de ensaio, é comparada com a intensidade do sinal do

soro sanguíneo negativo de controlo para determinar se a amostrar deverá ser considerada positiva ou negativa para a ligação entre os C3d e o complexo anticorpos/antigénios.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Identificação e condições de armazenamento Número de Produto 265400 de Deteção C3d

1. **C3dCJ** Conjugado C3d (P/N 265410; 1200 µL). Anticorpos C3d anti-humanos conjugados com ficoencitrina num recipiente baseado em fosfatos, que contém NaCl, Tween-20 e azida de sódio. SENSÍVEL À LUZ. Não expor diretamente à luz durante longos períodos de tempo. **Armazenar entre 2 a 8°C num local escuro durante 3 meses ou a ≤-65°C até à data de validade.** Poderá ser congelado novamente até 6 vezes a ≤-65°C, depois do primeiro descongelamento.
2. **C3dCS** Soro sanguíneo complementar (P/N 265415 ; 2 frascos-ampola x 360 µL). Soro sanguíneo de um dador masculino não transfundido. **Armazenar a ≤-65°C.** Poderá ser congelado novamente até 4 vezes, depois do primeiro descongelamento.
3. **C3dPCB** Microesfera de Controlo Positivo (P/N 265405; 24 µL). O tampão de armazenamento é baseado em fosfato e contém NaCl, Tween-20, azida de sódio e proteínas de bovino. SENSÍVEL À LUZ. **Armazenar a ≤-65°C.** Poderá ser congelado novamente até 6 vezes, depois do primeiro descongelamento.
4. **LSAWB** Tampão de Lavagem LSA (P/N 265001; 25 mL). Um recipiente baseado em fosfato que contém NaCl, Tween-20 e azida de sódio. **Armazenar entre 2 e 8°C e equilibrar a temperatura ambiente (20-24°C) antes da utilização.**

B. Avisos e Precauções

1. Para utilização em diagnósticos In Vitro.
2. Os materiais de origem humana utilizados na produção deste kit foram testados e validados negativamente para anticorpos de VIH, VHC e HBsAg, através de métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método de teste consegue oferecer total garantia que os agentes infecciosos não estão presentes. **Consequentemente, siga as Precauções Universais quando trabalhar com estes materiais.**
3. Os reagentes contêm, como conservante, 0,1% de azida de sódio, que poderá reagir com chumbo ou canalizações de cobre para formar azidas metálicas explosivas. Utilize água abundante quando deitar os materiais fora num lavatório.
4. A contaminação das amostras por bactérias, ou a presença de complexos imunitários ou outros agregados de imunoglobulina, poderão causar um aumento de ligações não específicas e resultados errados.
5. Depois de utilizados, deite fora todos os materiais segundo os regulamentos locais.
6. Para mais informações, consulte as Fichas de Dados de Segurança.
7. O soro sanguíneo complementar deixado entre 2 a 8°C durante longos períodos apresenta uma atividade complementar reduzida.
8. As microesferas e o conjugado são SENSÍVEIS À LUZ. Mantenha o período de exposição à luz abaixo de três horas.

C. Purificação ou Tratamento Necessário para a Utilização

1. Ver "Recolha e Preparação do Espécime."
2. Todos os componentes estão preparados para serem utilizados, não sendo necessária qualquer diluição.

D. Indicações de Instabilidade

1. Não utilize componentes ou controlos que estejam turvos ou que tenham passado o prazo de validade.

MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS Necessários mas NÃO FORNECIDOS

- Kits da Classe I da LIFECODES LSA (P/N 265100, LSA1) ou da Classe II LIFECODES LSA (P/N 265200, LSA2).
- Equipamento necessário para realizar o ensaio de Classe I ou de Classe II da LIFECODES LSA (ver o Folheto Informativo correspondente, LC976CE)

RECOLHA DO ESPÉCIME E PREPARAÇÃO DO SORO SANGUÍNEO

O sangue deverá ser recolhido sem anticoagulantes através de uma técnica asséptica e deverá ser testado enquanto ainda está fresco ou devidamente armazenado para minimizar a probabilidade de reacções falsas-positivas ou falsas-negativas, devidas a armazenamento incorreto ou contaminação do espécime. O soro sanguíneo deverá ser armazenado entre 2 e 8°C até 48 horas. Se o soro sanguíneo for armazenado durante mais de 48 horas, deverá ser congelado a; ou abaixo de; -20°C ou -80°C, durante um período de até 2 anos. Os laboratórios individuais deverão estabelecer e validar métodos para armazenar soro sanguíneo durante mais de 2 anos. Quando

armazenado ou expedido, o soro sanguíneo deverá ser separados dos glóbulos vermelhos. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos das amostras de soro sanguíneo.

PRECAUÇÃO: Não utilize soro sanguíneo microbiologicamente contaminado, hemolisado ou lipêmico, visto que estas amostras poderão dar resultados inconsistentes.

Antes do ensaio, todas as amostras deverão ser passadas brevemente por um misturador de vórtice e por uma centrifugadora (30 segundos para ~10 000xg) para aglomerar quaisquer partículas que possam estar presentes.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

PRECAUÇÕES:

- DEVERÁ OBRIGATORIAMENTE ter cuidado para evitar a contaminação do Tampão de Lavagem e do reagente C3d anti-humano. A contaminação inadvertida destes reagentes com soro sanguíneo humano poderá, subsequentemente, resultar num erro no teste.
- Uma amostra de soros de controlo positivos e negativos deverá ser incluída em cada teste, de modo a ajudar a determinar se ocorreu um erro técnico ou uma falha nos reagentes.
- O Soro Complementar é um reagente de soro negativo necessário para o Ensaio de Detecção C3d, como uma fonte normalizada do complemento.
- Adicionalmente, siga as precauções gerais descritas no Folheto Informativo (LC976CE) da LIFECODES LSA.

1. Ligue o instrumento Luminex, e deixe-o aquecer durante 30 minutos.
2. Retire a Mistura de Microesferas LSA, a Microesfera de Controlo Positivo C3d (C3dPCB), o Soro Complementar C3d (C3dCS) e o Conjugado C3d (C3dCJ) do congelador a -65°C e armazene-os num local escuro, à temperatura ambiente, até descongelar. Após o descongelamento, coloque-os imediatamente em gelo e proteja-os da luz.
3. Antes da utilização, deixe que o Tampão de Lavagem chegue à temperatura ambiente (20 a 24°C). Durante este período, utilize a Ficha de Formato da Placa (LC979) para atribuir uma posição à placa, para que cada um dos soros e dos controlos seja analisado. **Os Soros de Controlo Negativo (fornecido com os kits LSA1 e LSA2) é usado como controlo negativo.**
4. Cubra os poços não atribuídas da Placa de Filtro com uma cobertura de plástico adesiva. Faça uma "pre-molhagem" dos poços a serem usadas, com 100-300 µL de água destilada. Após 2-5 minutos, retire a água aspirando levemente usando um coletor de vácuo. (Ver as recomendações do fabricante para uma utilização correta).
5. Prepare as Microesferas LSA centrifugando brevemente (30 segundos) o frasco-ampola a ~600 – 800 x g para remover quaisquer microesferas ou líquido da tampa ou das paredes do frasco-ampola. Passe abundantemente pelo misturador de vórtice (~1 minuto) para fazer um re-suspensão homogênea das microesferas. Num frasco-ampola separado, combine 1 µL/amostra das C3dPCB com o volume apropriado de microesferas LSA (40 µL/amostra). Passe abundantemente pelo misturador de vórtice (~1 minuto) para fazer um re-suspensão homogênea das microesferas.
6. Adicione 40 µL de Mistura de Microesferas LSA com as C3dPCB para cada um dos poços atribuídos. Volte a passar o frasco-ampola da Microesfera LSA pelo misturador de vórtice a cada 2 minutos para manter as microesferas em suspensão, ao mesmo tempo que distribui as microesferas. Depois, passe o soro pela centrifugadora (30 segundos a ~10 000 x g) e adicione 10 µL de soro ou soro de controlo e, posteriormente, misture.

PRECAUÇÃO: É importante manter as +1 s re-suspensas, para assegurar que microesferas suficientes são divididas em partes iguais nos poços, além de assegurar tempos de contagem de microesferas baixos. Não passar as microesferas no misturador de vórtice de maneira intermitente fará com que as microesferas assentem na direção do fundo do tubo. Isto resultará numa quantidade diferencial de microesferas a serem dispensadas para os poços que poderão afetar adversamente os tempos de execução e a análise dos resultados.

7. Cubra a placa com uma cobertura de plástico adesivo e depois envolva em papel de alumínio ou numa caixa para proteger da luz. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-24°C) num local escuro numa plataforma rotativa (200 rotações por minuto). Reponha porções não utilizadas do soro de controlo, armazenando-as entre 2 e 8°C para uso futuro. Reponha as porções não utilizadas da Mistura de Microesferas LSA e de C3dPCB para armazenar a ≤-65°C, num local escuro, para utilização futura.
8. Depois de uma incubação durante 30 minutos, retire a cobertura de plástico adesivo e adicione 30 µL do C3dCS em cada poço, inclusive o de controlo negativo. **Reponha o C3dCS, armazenado a ≤-65°C, imediatamente após a utilização.** Cubra a placa com papel de alumínio ou com uma caixa para proteger da luz. Coloque na plataforma rotativa (a 200 rotações por minuto) ou passe gentilmente pelo misturador de vórtice a cada 5-10 minutos. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 24°C).
9. Depois de uma incubação durante 30 minutos, retire a cobertura de plástico adesivo e adicione 100 µL do Tampão de Lavagem a cada poço. Misture dando batimentos leves no lado da placa e aspirando gentilmente a mesma.

PRECAUÇÃO: O uso de uma potência de aspiração excessiva irá fazer com que as microesferas fiquem agarradas à membrana, o que poderá causar numa falha na amostra. Aplique o mínimo de pressão de aspiração necessária para aspirar as amostras.

10. Adicione 250 µL de Tampão de Lavagem a cada poço, aspire e depois repita o procedimento três vezes adicionais.

PRECAUÇÃO: Ao não efetuar uma lavagem completa, poderá reduzir a capacidade do conjugado de detetar os C3d ligados ao complexo anticorpos/antígenos e causar falsos negativos.

11. Centrifugue o C3dCJ durante 30 segundos numa microcentrifugadora (~600 – 800 x g). O C3dCJ está preparado e não é necessária qualquer diluição. Adicione 50 µL de C3dCJ a cada poço. Armazene o C3dCJ restante a 4°C até três meses ou a ≤-65°C até à data de validade.
12. Cubra a placa com papel de alumínio ou com uma caixa para proteger da luz. Coloque a plataforma rotativa (a 200 rotações por minuto) ou passe gentilmente pelo misturador de vórtice a cada 5-10 minutos. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 24°C).
13. Depois de uma incubação durante 30 minutos, retire a cobertura de plástico adesivo e adicione 100 µL do Tampão de Lavagem a cada poço. Misture dando batimentos leves no lado da placa e aspirando gentilmente a mesma.
14. Adicione 250 µL de Tampão de Lavagem a cada poço e aspire.
15. Usando uma ponta de uma pipeta limpa, adicione 200 µL de Tampão de Lavagem a cada poço e misture para re-suspender as microesferas.
16. Recolha os dados com o instrumento Luminex, seguindo as recomendações do fabricante **e use um molde Luminex C3d (consulte o LIFECODES LSA para informação específica sobre o lote)**. Atrasos superiores a 3 horas à temperatura ambiente, poderão aumentar a probabilidade de obter reações falsas positivas ou falsas negativas. Reponha a porção não utilizada do Tampão de Lavagem, armazenando-a entre 2 e 8°C para uso futuro.

RESULTADOS

Deteção C3d: Para analisar os resultados para um lote de amostras:

1. Crie uma folha de cálculo no Excel, abrindo uma cópia do ficheiro CSV de saída, com os resultados do lote Luminex e "Guarde como" um ficheiro de Excel. Este ficheiro será usado nos cálculos utilizados para analisar os resultados.
2. A partir ad Folha de Cálculo de Registos específica para um lote, fornecida com o Kit LSA, copie o nome do antígeno correspondente a cada microesfera.
3. De seguida, subtraia os valores MFI do soro de Controlo Negativo (MFI ou soro NC) a partir do RAW MFI para cada microesfera individual, a fim de calcular o MFI de Fundo Ajustado (BG Ajustado).

(a) MFI Ajustado ao BG = MFI de uma amostra – MFI do soro NC

4. Seguidamente, divida o MFI Ajustado ao BG pelo MFI do Controlo Calculado (CalcCON) do seu locus respetivo, para gerar uma razão corrigida em relação às condições de fundo (BCR-Neg). A CalcCON para cada locus é o valor MFI em bruto da microesfera de antígenos com classificação mais baixa para o respetivo locus.

(b) BCR-Neg = $\frac{\text{MFI Ajustado ao BG do antígeno}}{\text{Valor Bruto Menor do MFI do locus}}$

5. Por fim, divida o MFI Ajustado ao BG do antígeno através do valor MFI correspondente ao antígeno do soro do Controlo Negativo LSA (NC) para gerar a força relativa (R-Strength).

(c) R-Strength = $\frac{\text{MFI Ajustado ao BG do antígeno}}{\text{Valor Bruto do MFI do antígeno}}$

Uma microesfera é considerada positiva se dois ou mais dos valores ajustados estiverem acima dos valores limite mínimos. Consulte o Certificado de Análise do produto de Deteção C3d (2654000) para os valores limite mínimos negativos pré-definidos. É possível obter uma sensibilidade maior ou menor, ajustando o valor limite mínimo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade da Deteção C3d está incorporado no sistema de teste através da inclusão da Microesfera de Controlo Positivo e do Soro de Controlo Positivo e Negativo (fornecido com os kits LSA1 e LSA2). Estes controlos deverão ser incluídos em cada teste, de modo a ajudar a determinar se ocorreu um erro técnico ou uma falha nos reagentes. **O Soro de Controlo Positivo irá reagir com uma quantidade de microesferas LSA conjugadas, gerando um padrão semelhante ao encontrado no gráfico de deteção C3d.** O Soro de Controlo Negativo irá reagir com poucas, se alguma, das microesferas conjugadas com LSA.

A Microesfera de Controlo Positivo C3d deverá produzir valores MFI ≥10 000, num ensaio feito através do soro de controlo negativo. Valores de amostras inferiores a 10 000 MFI poderão ser um indicador de que não foi adicionado C3dCJ suficiente, que o ensaio poderá ter sido lavado de forma insuficiente ou que o C3dCJ poderá estar comprometido. A contagem de microesferas deverá ter pelo menos 40 eventos.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Poderão aparecer resultados errados devido à contaminação bacteriológica dos materiais de teste, períodos de incubação inadequados, lavagem ou decantação inadequada das microesferas, exposição do C3dCJ a luz difusa ou omissão dos reagentes ou passos do teste.

A presença de complexos imunitários, ou outros agregados de imunoglobulina na amostra de soro, poderá causar uma ligação não específica e produzir resultados errados neste ensaio.

As titulações de anticorpos do soro são específicas para a amostra e para o momento de análise. Se muitas das microesferas estiverem a produzir valores MFI acima dos 15 000, poderá ser necessário diluir o soro.

Devido à complexidade dos testes HLA, e à multiplicidade de factores que poderão afetar a cascata complementar, levando à formação de C3d, os resultados deverão ser revistos e interpretados por profissionais qualificados. A utilização de soro de controlo e valores limite mínimos diferentes daqueles fornecidos no Certificado de Análise, não foi validada.

Este teste, por si só, não deverá ser usado para tomar decisões clínicas.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

(Consulte também o Folheto Informativo Classe I e II LC976CE da LIFECODES LSA).

PROBLEMA	POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Contagem de Microesferas Baixa, apenas para as C3dPCB	Microesferas insuficientes adicionadas à Mistura de Microesferas LSA	Agitar em vórtex pulsado para re-suspender completamente, evitando o pipetamento <3 µL, utilizando pipetas calibradas
	Falhas em instrumentos - descalibrados	Consultar o Manual Luminex
	Microesferas de fotobranqueamento	Utilize um novo frasco-ampola de C3dPCB
Valores MFI com soro do Controlo Positivo C3d <10 000 MFI	Fotobranqueamento ou C3dCJ insuficiente adicionado à reação	Repetir o ensaio. Utilize um novo frasco-ampola de C3dCJ
	Lavagem insuficiente	Repetir o ensaio e monitorizar as lavagens
MFI baixo para Soro de Controlo Positivo	Adição de uma amostra incorreta	Repetir o ensaio com a amostra de controlo correta
	C3dCJ insuficiente adicionado à reação	Repetir o ensaio com a quantidade correta de C3dCJ
	C3dCS insuficiente ou ausência do mesmo na reação	Repetir o ensaio adicionando C3dCS
	Temperatura de ensaio baixa	Confirme que o ensaio é realizado a 20°C-24°C. Experimente a temperatura mais elevada da gama para MFI maiores.
Padrão anómalo para o Soro de Controlo Positivo	Adição de uma amostra incorreta	Repetir o ensaio com a amostra de controlo correta
	Lavagem insuficiente	Repetir o ensaio e monitorizar as lavagens
MFI elevado para o Soro de Controlo Negativo (>1500 MFI)	Lavagem insuficiente	Repetir o ensaio e monitorizar as lavagens, para assegurar que as microesferas são re-suspensas durante a lavagem
		Reduzir a potência da aspiração

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Quando a Detecção C3d da LIFECODES é utilizada de acordo com os procedimentos supramencionados, os resultados irão revelar a presença ou a ausência de complemento ligado ao complexo anticorpos/antígenos.

Um estudo comparativo com 142 amostras foi levado a cabo entre a Detecção C3d da LIFECODES e a Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC). Para este conjunto de amostras, a sensibilidade da Detecção C3d da LIFECODES foi superior à do teste CDC para a deteção de complementos que ligam o anticorpo HLA nas amostras de soro positivas, conforme foi medido nos ensaios de Classe I e II da LIFECODES LSA.

REFERÊNCIAS

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.

FABRICANTE

Fabricante: Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 EUA. Telephone: +1-203-328-9500, 888-329-0255
Fax: +1-203-328-9599

Representante Autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322 Alemanha
Telephone: (+49) 6074-84 20 -0, Fax: (+49) 6074-84 20-99

Serviço de Apoio Técnico Europeu: +32/3 385 47 91

Emitido em: Rev 0, 2015-08-21

