

Documentație despre produs și traduceri disponibile la: WWW.IMMUCOR.COM

PROSPECTUL PRODUSULUI

LIFECODES® C3d Detection




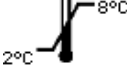


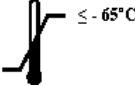



A se utiliza pentru diagnosticarea *in vitro*.

CUPRINS

Definiția simbolurilor	1	Recoltarea și prepararea probelor	2
Domeniu de utilizare	1	Instrucțiunile de utilizare	3
Sumar și explicație	1	Rezultate	4
Principiile procedurii	1	Controlul calității	4
Reactivi prevăzuți	2	Restricții ale procedurii	4
A. Identificare și condiții de depozitare.....	2	Probleme tehnice	5
B. Avertizări și precauții.....	2	Caracteristici specifice de performanță	5
C. Purificare sau tratare pentru utilizare...	2	Referințe	5
D. Indicații de instabilitate.....	2	Producător și reprezentant	
Materiale necesare, dar neprevăzute	2	autorizat	6

DEFINIȚIA SIMBOLURILOR

(Etichetele produselor și documentația suplimentară)

Număr lot		Număr catalog		Data expirării		Limite de temperatură (depozitare)	
Producător		Sensibil la lumină (A se feri de lumină)		Temperatura (depozitare)		Suficient pentru N teste	
Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană		Avertizare					

DOMENIU DE UTILIZARE

LIFECODES® C3d Detection este un test calitativ pentru detectarea legăturii complementului la complexul anticorp/antigen din serul uman.

SUMAR ȘI EXPLICAȚIE

Acest produs are scopul de a detecta legătura complementului C3d la complexul anticorp/antigen.

Acest produs conține anticorp anti-uman C3d conjugat cu PE (ficoeritrină), microsferă de control pozitiv, ser uman care conține componente și soluție tampon pentru spălare.

PRINCIPIILE PROCEDURII

O alicotă de antigeni HLA legați la microsferă se va incuba cu un volum mic de probă de ser pentru test. După această incubare inițială, se adaugă reactiv de ser negativ ca sursă de complement pentru o incubare suplimentară. Microsferă sensibilizată sunt apoi spălate pentru a înlătura anticorpul liber. După aceea, se adaugă un anticorp anti-uman C3d conjugat cu ficoeritrină. După o altă incubare, proba de testare este spălată, diluată și analizată pe instrumentul Luminex. Intensitatea semnalului fiecărei microsferă, pentru proba de testare, este comparată cu intensitatea semnalului serului de control negativ pentru a se determina dacă proba trebuie să fie considerată pozitivă sau negativă pentru C3d legat la complexul anticorp/antigen.

REACTIVI PREĂZUȚI

A. Identificare și condiții de depozitare Număr produs 265400 C3d Detection

1. **C3dCJ** Conjugat C3d (P/N 265410; 1200 µL). Anticorp anti-uman C3d conjugat cu PE într-o soluție tampon de depozitare pe bază de fosfat, pregătit pentru utilizare, care conține NaCl, Tween-20 și azidă de sodiu. SENSIBIL LA LUMINĂ. A se feri de lumină directă pe perioade îndelungate de timp. **A se păstra la 2 - 8°C la întuneric până la 3 luni sau la ≤-65°C până la data expirării.** Poate fi recongelat de până la 6 ori la ≤-65°C după decongelarea inițială.
2. **C3dCS** Complement seric (P/N 265415 ; 2 flacoane x 360 µL). Ser de la un donator de sex masculin fără transfuzie. **A se păstra la ≤-65°C.** Poate fi recongelat de până la 4 ori după decongelarea inițială.
3. **C3dPCB** Microsferă de control pozitiv C3d (P/N 265405; 24 µL). Soluția tampon de depozitare este o soluție tampon pe bază de fosfat care conține NaCl, Tween-20, azidă de sodiu și proteine bovine. SENSIBILĂ LA LUMINĂ. **A se păstra la ≤-65°C.** Poate fi recongelată de până la 6 ori la ≤-65°C după decongelarea inițială.
4. **LSAWB** Soluție tampon pentru spălare LSA (P/N 265001; 25 mL). O soluție tampon pe bază de fosfat care conține NaCl, Tween-20 și azidă de sodiu. **A se păstra la 2 - 8°C** și a se echilibra la temperatura camerei (20-24°C) înainte de utilizare.

B. Avertizări sau precauții

1. A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro.
2. Materialul din sursă umană, folosit la producerea acestui kit, a fost testat și găsit negativ pentru anticorpi HIV, HCV și HBsAg prin metode aprobate de FDA. Cu toate acestea, nicio metodă de testare nu poate oferi o asigurare completă că agenții infecțioși sunt absenți. Ca urmare, **luați Măsuri de Precauție Universale** când lucrați cu aceste materiale.
3. Reactivii conțin 0,1% azidă de sodiu drept conservant, ceea ce poate reacționa cu țevile din plumb și cupru și poate forma azide de metal explozive. Folosiți cantități însemnate de apă atunci când aruncați materialele în chiuvetă.
4. Contaminarea bacteriană a probelor sau prezența complexelor imune sau a altor aglomerări de imunoglobulină poate duce la legarea nespecifică crescută și la rezultate eronate.
5. După întrebuințare, aruncați toate materialele conform reglementărilor locale.
6. A se vedea Fișele Tehnice de Securitate pentru informații suplimentare.
7. Complementul seric lăsat la 2 - 8°C pe perioade îndelungate de timp demonstrează o activitate redusă a complementului.
8. Microsferele și conjugatul sunt SENSIBILE LA LUMINĂ. Expunerea obișnuită la lumină nu trebuie să depășească trei ore.

C. Purificarea sau tratarea necesară pentru utilizare

1. A se vedea "Recoltarea și prepararea probelor."
2. Toate componentele sunt pregătite pentru utilizare și nu este necesară diluarea.

D. Indicații de instabilitate

1. Nu folosiți componente sau substanțe de control care sunt tulburi sau expirate.

MATERIALE, REACTIVI ȘI ECHIPAMENT necesare, dar NEPREVĂZUTE

- Kit-uri LIFECODES LSA Clasa I (P/N 265100, LSA1) sau LIFECODES LSA Clasa a II-a (P/N 265200, LSA2).
- Echipament necesar pentru efectuarea testului LIFECODES LSA Clasa I sau Clasa a II-a (a se vedea Prospectul Produsului corespunzător, LC976CE)

RECOLTAREA ȘI PREPARAREA PROBELOR

Sângele trebuie să fie recoltat fără anticoagulant prin metoda antiseptică și trebuie să fie testat când este încă proaspăt sau depozitat corect pentru a minimaliza șansa unor reacții fals-pozitive sau fals-negative datorate depozitării incorecte sau contaminării probelor. Serul trebuie să fie păstrat la 2 - 8°C timp de 48 de ore. Dacă serul trebuie să fie depozitat mai mult de 48 de ore, trebuie să fie congelat la cel puțin -20°C sau -80°C timp de 2 ani. Fiecare laborator trebuie să stabilească și să valideze metodele de depozitare a serului pe o perioadă mai mare de 2 ani. Serul trebuie să fie separat de globulele roșii când este depozitat sau expediat. Evitați congelările și decongelările repetate ale probelor de ser.

ATENȚIE: Nu folosiți ser contaminat microbiologic, hemolizat sau lipemic, deoarece aceste probe pot duce la rezultate neconsecvente.

Înainte de testare, toate probele trebuie să fie agitate și centrifugate sumar (30 secunde la ~10.000xg) pentru a dispersa orice particule de material care ar putea fi prezente.

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

PRECAUȚII:

- TREBUIE să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita contaminarea soluției tampon pentru spălare și a reactivului anti-uman C3d. Contaminarea accidentală a acestor reactivi cu ser uman poate duce ulterior la eșecul testului.
- O probă de ser de control pozitiv și negativ trebuie să fie inclus cu fiecare test pentru a ajuta la determinarea unor posibile erori tehnice sau eșecuri ale reactivilor.
- Complementul seric este un reactiv seric negativ necesar pentru testul de detectare C3d ca sursă standard a complementului.
- În plus, urmați precauțiile generale descrise în Prospectul produsului LIFECODES LSA (LC976CE).

1. Porniți instrumentul Luminex pentru a permite încălzirea timp de 30 de minute.
2. Scoateți amestecul de microsferă LSA, microsfera de control pozitiv C3d (C3dPCB), complementul seric C3d (C3dCS) și conjugatul C3d (C3dCJ) din congelator -65°C și păstrați-le la întuneric la temperatura camerei până când se dezgheață. Odată decongelate, puneți-le imediat pe gheață și feriți-le de lumină.
3. Aduceți soluția tampon la temperatura camerei (20 până la 24°C) înainte de utilizare. În acest timp, folosiți Fișa format placă (LC979) pentru a stabili o poziție pe placă pentru fiecare dintre serurile și substanțele de control care urmează a fi analizate. **Serul de control negativ (prevăzut cu kit-urile LSA1 și LSA2) este utilizat drept control negativ.**
4. Acoperiți alveolele nedesemnate ale plăcii filtrante cu o peliculă din plastic adeziv. Umeziți apoi alveolele care trebuie folosite cu 100-300 µL de apă distilată. După 2-5 minute, scoateți apa prin aspirație ușoară folosind colectorul cu vid. (Pentru o utilizare corectă, vezi recomandările producătorului).
5. Pregătiți microsferile LSA centrifugând eprubeta pentru scurt timp (30 secunde) la ~600 – 800 x g pentru a îndepărta orice microsferă sau lichid din capacul sau de pe pereții eprubetei. Agitați bine (~1 minut) pentru a resuspenda uniform microsferile. Într-o eprubetă separată, combinați 1 µL/probă de C3dPCB cu volumul adecvat de microsferă LSA (40 µL/probă). Agitați bine (~1 minut) pentru a resuspenda uniform microsferile.
6. Adăugați 40 µL de amestec de microsferă LSA cu C3dPCB la fiecare alveolă desemnată. Agitați din nou eprubeta cu microsferă LSA o dată la 2 minute pentru a păstra microsferile în suspensie în timp ce le distribuiți. Apoi centrifugați serul (30 secunde la ~10.000 x g) și adăugați 10 µL de ser sau ser de control și amestecați.

ATENȚIE: Este important să mențineți microsferile resuspendate pentru a vă asigura că sunt alicotate suficiente microsferă în alveole și pentru a asigura o numărare rapidă. Dacă microsferile nu sunt agitate intermitent, acestea se vor depune pe fundul eprubetei. Aceasta va duce la distribuția diferențiată a microsferelor în alveole, ceea ce ar putea afecta în mod negativ durata centrifugării și analiza rezultatelor.

7. Acoperiți placa cu o peliculă din plastic adeziv, apoi acoperiți-o cu folie sau puneți-o într-o cutie pentru a o proteja de lumină. Incubați timp de 30 minute la temperatura camerei (20-24°C), la întuneric, pe o platformă rotativă (200 rotații pe minut). Returnați porțiunile de ser de control nefolosite spre depozitare la 2 - 8°C, pentru o utilizare ulterioară. Returnați porțiunile nefolosite de amestec de microsferă LSA și C3dPCB spre depozitare la ≤-65°C, la întuneric, pentru o utilizare ulterioară.
8. După 30 de minute de incubare, înlăturați pelicula din plastic adeziv și adăugați 30 µL din C3dCS în fiecare alveolă, inclusiv alveola de control negativ. **Returnați C3dCS spre depozitare la ≤-65°C imediat după utilizare.** Acoperiți placa cu folie sau puneți într-o cutie pentru a o proteja de lumină. Puneți-o pe o platformă rotativă (la 200 rotații pe minut) sau agitați ușor o dată la 5-10 minute. Incubați timp de 30 minute la temperatura camerei (20 până la 24°C).
9. După 30 de minute de incubare, îndepărtați pelicula din plastic adeziv și adăugați 100 µL de soluție tampon pentru spălare în fiecare alveolă. Amestecați lovind ușor latura plăcii și aspirați ușor placa.

ATENȚIE: Folosirea unei presiuni mari de evacuare va face ca microsferile să se lipească de membrană și poate duce la eșecul probei. Folosiți presiunea minimă de evacuare necesară aspirării probei.

10. Adăugați 250 µL de soluție tampon pentru spălare la fiecare alveolă, aspirați și repetați de încă trei ori.

ATENȚIE: O spălare incompletă poate reduce capacitatea conjugatului de a detecta legătura C3d la complexul anticorp/antigen și poate duce la rezultate negative false.

11. Centrifugați C3dCJ timp de 30 secunde într-o microcentrifugă (~600 – 800 x g). C3dCJ este pregătit pentru utilizare și nu este necesară diluarea. Adăugați 50 µL de C3dCJ la fiecare alveolă. Păstrați C3dCJ rămas la 4°C până la trei luni sau depozitați la ≤-65°C până la data expirării.
12. Acoperiți placa cu folie sau puneți-o într-o cutie pentru a o feri de lumină. Puneți-o pe o platformă rotativă (la 200 rotații pe minut) sau gitați ușor la fiecare 5-10 minute. Incubați timp de 30 minute la temperatura camerei (20 până la 24°C).
13. După 30 de minute de incubare, înlăturați pelicula din plastic adeziv și adăugați 100 µL de soluție tampon pentru spălare la fiecare alveolă. Amestecați lovind ușor latura plăcii și aspirați ușor placa.

14. Adăugați 250 µL de soluție tampon pentru spălare la fiecare alveolă și aspirați.
15. Folosind un vârf curat de pipetă, adăugați 200 µL de soluție tampon pentru spălare la fiecare alveolă și amestecați pentru a resuspenda microsferile.
16. Colectați datele cu ajutorul instrumentului Luminex conform recomandărilor producătorului și **utilizați un model Luminex C3d (consultați LIFECODES LSA pentru informații specifice privind lotul)**. Întârzierile mai mari de 3 ore la temperatura camerei pot spori posibilitatea de a obține reacții fals-pozitive sau fals-negative. Returnați porțiunea nefolosită de soluție tampon pentru spălare spre depozitare la 2 - 8°C pentru o utilizare ulterioară.

REZULTATE

C3d Detection: Pentru a analiza rezultatele pentru un lot de probe:

1. Creați o fișă de lucru în Excel deschizând o copie a fișierului CVS obținut cu rezultatele din lotul Luminex și "Save as"(Salvați ca) fișier Excel. Acest fișier va fi folosit pentru calculele utilizate în vederea analizării rezultatelor.
2. Din Fișa de lucru de înregistrare specifică lotului care a fost prevăzută cu Kit-ul LSA, copiați numele antigenului care corespunde fiecărei microsferă.
3. În continuare, scădeți valorile MFI ale serului de control negativ (MFI al serului NC) din MFI brut pentru fiecare microsferă pentru a calcula MFI ajustat de fond (BG Ajustat).

$$(a) \text{ BG Ajustat MFI} = \text{MFI probei} - \text{MFI serului NC}$$

4. Apoi, împărțiți MFI BG ajustat la MFI serului de control calculat (CalcCON) al locusului respectiv pentru a genera raportul corectat de fond (BCR-Neg). CalcCON pentru fiecare locus este valoarea MFI brută a microsferii de antigen celei mai mici pentru acel locus.

$$(b) \text{ BCR-Neg} = \frac{\text{MFI BG Ajustat de antigen}}{\text{Cea mai mică valoare MFI brută de locus}}$$

5. În final, împărțiți MFI BG Ajustat de antigen la valoarea MFI corespunzătoare a antigenului pentru serul de control negativ LSA (NC) pentru a genera valoarea relativă (valoare R).

$$(c) \text{ Valoarea R} = \frac{\text{MFI BG ajustat de antigen}}{\text{MFI valoare brută pentru antigen}}$$

O microsferă este considerată pozitivă dacă două sau mai multe valori ajustate sunt peste valorile de referință. Consultați Certificatul de Analiză al produsului C3d Detection (265400) pentru valorile de referință pozitive și negative prestabilite. Se pot obține sensibilități superioare sau inferioare prin ajustarea valorii de referință.

CONTROLUL CALITĂȚII

Controlul calității pentru C3d Detection este integrat în sistemul de testare prin includerea microsferii de control pozitiv și a serului de control pozitiv și negativ (prevăzute cu kit-urile LSA1 și LSA2). Aceste mijloace de control trebuie să fie incluse în fiecare test pentru a ajuta la determinarea erorilor tehnice sau eșecurilor reactivilor. Serul de control pozitiv va reacționa cu o serie de microsferă conjugate LSA, generând un model similar cu cel găsit în graficul de detectare C3d. Serul de control negativ va reacționa cu foarte puține sau nu va reacționa deloc cu microsferile conjugate LSA.

Microsfera de control pozitivă C3d trebuie să prezinte valori MFI ≥ 10.000 cu un test care folosește ser de control negativ. Valorile probelor mai mici de 10.000 MFI pot indica că nu a fost adăugat suficient C3dCJ, că testul poate fi spălat insuficient sau că C3dCJ poate fi compromis.

Numărul de microsferă trebuie să fie de cel puțin 40 evenimente.

RESTRICȚII ALE PROCEDURII

Pot apărea rezultate eronate datorită contaminării bacteriene a materialelor de testare, a perioadelor inadecvate de incubare, a spălării sau decantării inadecvate a microsferelor, expunerii C3dCJ la lumină difuză sau a omiterii reactivilor sau etapelor de testare.

Prezența complexelor imune sau a altor aglomerări de imunoglobulină în proba de ser poate determina o legătură nespecifică ridicată și poate conduce la rezultate eronate ale testului.

Titrurile de anticorpi ai serului sunt specifice probei și momentului. Dacă numeroase microsferă produc valori MFI peste 15.000, s-ar putea să fie necesar să diluați serul.

Datorită naturii complexe a testării HLA și a factorilor multipli care pot afecta cascada de componente care conduce la formarea C3d, personalul calificat trebuie să analizeze și să interpreteze rezultatele. Utilizarea unui ser de control și a valorilor de referință diferite de cele prevăzute în Certificatul de Analiză nu a fost validată.

Acest test nu trebuie să fie folosit ca singura bază pentru luarea unei decizii clinice.

PROBLEME TEHNICE

(A se vedea, de asemenea, prospectul produsului LIFECODES LSA Clasa I și Clasa a II-a LC976CE).

PROBLEMĂ	CAUZĂ POSIBILĂ	SOLUȚIE
Număr redus de microsferă numai pentru C3dPCB	Nu s-au adăugat suficiente microsferă la amestecul de microsferă LSA	Pulsați agitatorul pentru a resuspenda complet, evitați adăugarea cu pipeta <3 μL, folosiți pipete calibrate
	Instrument defect – nu este calibrat	Vezi Manualul Luminex
	Microsferă foto-decolorate	Folosiți o eprubetă nouă de C3dPCB
Valori MFI de control pozitiv C3d cu Ser <10.000 MFI	C3dCJ foto-decolorat sau insuficient adăugat la reacție	Repețiți testul. Folosiți o eprubetă nouă de C3dCJ
	Spălare insuficientă	Repețiți testul și monitorizați spălările
MFI redus pentru ser de control pozitiv	S-a adăugat o probă incorectă	Repețiți testul cu o probă de control corectă
	Nu s-a adăugat suficient C3dCJ la reacție	Repețiți testul cu cantitatea corectă de C3dCJ
	Insuficient C3dCS sau nu s-a adăugat deloc la reacție	Repețiți testul adăugând C3dCS
	Temperatură joasă a testului	Confirmați efectuarea testului la 20°C-24°C. Încercați limita superioară de temperatură pentru MFI mai ridicat.
Model anormal pentru ser de control pozitiv	S-a adăugat o probă incorectă	Repețiți testul cu o probă de control corectă
	Spălare insuficientă	Repețiți testul și monitorizați spălările
MFI ridicat pentru ser de control negativ (>1.500 MFI)	Spălare insuficientă	Repețiți testul și monitorizați spălările pentru a vă asigura că microsferăle sunt resuspendate în timpul spălării
		Reduceți puterea collectorului

CARACTERISTICI SPECIFICE DE PERFORMANȚĂ

Atunci când LIFECODES C3d Detection este folosit în conformitate cu procedura descrisă mai sus, rezultatele dezvăluie prezența sau absența complementului legat la complexul anticorp/antigen.

S-a desfășurat un studiu comparativ care a folosit 142 de probe între LIFECODES C3d Detection și citotoxicitate dependentă de complement (CDC). Pentru acest set de probe, sensibilitatea LIFECODES C3d Detection a fost mai bună decât testul CDC pentru detectarea anticorpului HLA legat la complement în probele de ser pozitiv după cum este măsurat de testele LIFECODES LSA Clasa I și Clasa a II-a.

REFERINȚE

- 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.
- 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.
- 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.
- Lan, J. et al. Clinical Relevance of C3d-Binding Donor-Specific Antibodies in Late Kidney Allograft Failure. *Am J Transplant*. 2015; 15(S3).
- 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.
- Toutirais, O. et al. Clinical outcome of heart transplant recipients with complement binding donor specific antibodies. *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 431.
- Dubois, V. et al. Pregnancy and Donor-Specific HLA-antibody-mediated rejection in young women after liver transplantation: "Liaisons Dangereuses"? *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 306.
- Wahrmann, M. et al. Modified solid-phase alloantibody detection for improved crossmatch prediction. *Human Immunol*, 2013; 74(1): 32–40.
- 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.
- Giżej, 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.
- 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.

PRODUCĂTOR ȘI REPREZENTANT AUTORIZAT

Producător: Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 S.U.A.

Telefon: (+1) 203-328-9500, 888-329-0255 Fax: 203-328-9599

Reprezentant autorizat: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322, Germania

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

Serviciul Tehnic din Europa: +32/3 385 47 91

Emis: Rev. 0, 2015-08-21

