

## PRODUKTINFORMATION

### LIFECODES® C3d-detektering




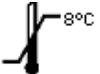






För *in vitro*-diagnostik.

#### INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| <b>Beskrivning av symboler</b> .....                      | 1 | <b>Provtagning och beredning</b> .....                 | 2 |
| <b>Användningsområde</b> .....                            | 1 | <b>Bruksanvisning</b> .....                            | 3 |
| <b>Översikt och förklaring</b> .....                      | 1 | <b>Resultat</b> .....                                  | 4 |
| <b>Procedurens principer</b> .....                        | 1 | <b>Kvalitetskontroll</b> .....                         | 4 |
| <b>Reagenser</b> .....                                    | 2 | <b>Procedurens begränsningar</b> .....                 | 4 |
| A. Identifiering och förvaring.....                       | 2 | <b>Felsökning</b> .....                                | 5 |
| B. Varningar eller försiktighetsåtgärder.....             | 2 | <b>Specifika prestandaegenskaper</b> .....             | 5 |
| C. Rening eller användningsbehandling...                  | 2 | <b>Referenser</b> .....                                | 5 |
| D. Instabilitetsindikationer.....                         | 2 | <b>Tillverkare och auktoriserad representant</b> ..... | 6 |
| <b>Material som behövs, men inte tillhandahålls</b> ..... | 2 |  |   |

### BESKRIVNING AV SYMBOLER

(produktetiketter och kompletterande dokument)

|  |   |                                 |   |                         |  |                                 |   |
|--|---|---------------------------------|---|-------------------------|--|---------------------------------|---|
| Partinummer  |  | Katalognummer                   |  | Sista förbrukningsdatum |          | Temperaturintervall (förvaring) |  8°C |
| Tillverkare  |  | Ljuskänsligt (skyddas mot ljus) |  | Temperatur (förvaring)  |  ≤ -65°C | Räcker för N-test               |      |
| Auktoriserad representant i Europeiska Gemenskapen |  | Varning!                        |  |                         |  |                                 |   |

### ANVÄNDNINGSMÅL

LIFECODES® C3d-detektering är en kvalitativ provanalys för att detektera komplement som är bundet till antikropps-/antigenkomplex i serum av mänskligt ursprung.

### ÖVERSIKT OCH FÖRKLARING

Produkten är till för att detektera C3d-komplement som är bundet till antikropps-/antigenkomplex.

Produkten innehåller PE-konjugerade antihumana C3d-antikroppar, positiva kontrollmikrosfärer, komplement som innehåller serum av mänskligt ursprung och tvättbuffert.

### PROCEDURENS PRINCIPER

En alikvot med mikrosfärer som är bundna HLA-antigener får inkubera med en liten mängd testserumprov. Efter denna första inkubering tillsätts negativt serumreagens som en källa till komplement för en till inkubering. De sensibiliserade mikrosfärerna tvättas sedan för att avlägsna icke-bundna antikroppar. En antihuman C3d-antikropp som konjugerats till fykoerytrin tillsätts sedan. Efter en till inkubering tvättas, spås och analyseras provet med Luminex-instrumentet. Signalintensiteten från varje mikrosfär för testprovet jämförs med signalintensiteten hos negativa kontrollserum, för att fastställa om provet ska anses positivt eller negativt för C3d som är bundet till antikropps-/antigenkomplex.

## REAGENSER

---

### A. Identifiering och förvaring

#### C3d-detektering produktnummer 265400

1. **C3dCJ** C3d-konjugat (komponentnummer 265410; 1200 µL). PE-konjugerad antihuman C3d-antikropp i en bruksfärdig fosfatbaserad förvaringsbuffert innehållande NaCl, Tween-20 och natriumazid. LJUSKÄNSLIGT. Skyddas mot direkt ljus under långa tidsperioder. **Förvaras i 2 - 8°C mörkt i upp till 3 månader eller i ≤-65°C fram till sista förbrukningsdatum.** Produkten får frysas upp till 6 gånger i ≤-65°C efter första tiningen.
2. **C3dCS** Komplementserum (komponentnummer 265415; 2 flaskor x 360 µL). Serum från manlig givare utan transfusion. **Förvaras i ≤-65°C.** Produkten får frysas om upp till 4 gånger efter första tiningen.
3. **C3dPCB** C3d-positiv kontrollmikrosfär (komponentnummer 265405; 24 µL). Förvaringsbufferten är en fosfatbaserad buffert innehållande NaCl, Tween-20, natriumazid och bovina proteiner. LJUSKÄNSLIGT. **Förvaras i ≤-65°C.** Produkten får frysas om upp till 6 gånger efter första tiningen.
4. **LSAWB** LSA-tvättbuffert (komponentnummer 265001; 25 mL). Fosfatbaserad buffert innehållande NaCl, Tween-20 och natriumazid. **Förvaras i 2 till 8°C** och anpassas till rumstemperatur (20-24°C) före användning.

### B. Varningar eller försiktighetsåtgärder

1. För in vitro-diagnostik.
2. Källmaterial av mänskligt ursprung som används i tillverkningen av denna sats har testats och befunnits vara negativt avseende antikroppar mot HIV, HCV och HBsAg med FDA-godkända metoder. Dock kan ingen testmetod med absolut säkerhet garantera att smittsamma ämnen inte förekommer. Vidta därför **universella försiktighetsåtgärder** vid arbete med dessa material.
3. Reagenserna innehåller 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel, vilka kan reagera med bly- och kopparrör och bilda explosiva metallazider. Använd stora mängder vatten vid kassering av material i avlopp.
4. Bakteriell kontaminering av prov eller förekomst av immunkomplex eller andra immunglobulinaggregat kan leda till icke-specifik bindning och felaktiga resultat.
5. Kassera allt material efter användning enligt lokala bestämmelser.
6. Se säkerhetsdatablad för ytterligare information.
7. Komplementserum som får stå i 2 - 8°C länge har påvisat minskad komplementaktivitet.
8. Mikrosfärer och konjugat är LJUSKÄNSLIGA. Normal exponering är högst tre timmar.

### C. Rening eller användningsbehandling

1. Se "Provtagning och beredning".
2. Alla komponenter är bruksfärdiga. Spädning behövs inte.

### D. Instabilitetsindikationer

1. Använd inte komponenter eller kontroller som är grumliga eller äldre än sista förbrukningsdatumet.

## MATERIAL, REAGENSER OCH UTRUSTNING som behövs men INTE TILLHANDAHÅLLS

---

- Sats med LIFECODES LSA klass I (komponentnummer 265100, LSA1) eller LIFECODES LSA klass II (komponentnummer 265200, LSA2).
- Utrustning som behövs för att utföra provanalys i LIFECODES LSA klass I eller klass II (se motsvarande produktinformation, LC976CE)

## PROVTAGNING OCH BEREDNING

---

Blodtagning sker utan antikoagulationsmedel med aseptisk teknik och måste testas färskt för att minska risken för falska positiva eller falska negativa reaktioner på grund av felaktig förvaring eller kontaminering av provet. Serum förvaras i 2 - 8°C i upp till 2 dygn. Om serum ska förvaras längre än 2 dygn bör det frysas i eller under -20°C eller -80°C i upp till 2 år. Laboratorier måste fastställa och validera metoder för förvaring av serum i mer än 2 år. Serum måste skiljas från röda celler vid förvaring eller transport. Undvik upprepade frysnings och tining av serumprov.

**FÖRSIKTIGHET:** Använd inte mikrobiologiskt kontaminerat, hemoliserat eller lipemiskt serum, eftersom sådana prov kan ge ojämnt resultat.

Före provanalys måste alla prov virvlas och centrifugeras kort (30 sekunder vid ~10 000 x g) för att pelletera eventuellt förekommande partiklar.

## BRUKSANVISNING

### FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

- Försiktighetsåtgärder MÅSTE vidtas för att förebygga kontaminering av tvättbuffert och antihuman C3d-reagens. Oavsiktlig kontaminering av dessa reagenser med serum av mänskligt ursprung kan resultera i att testet misslyckas.
  - Prov med positivt och negativt kontrollserum måste medfölja varje test för att fastställa om tekniskt fel eller reagensfel har inträffat.
  - Komplementserum är en negativ serumreagens som krävs för provanalys för C3-detektering, som standardkomplementkälla.
  - Följ även de allmänna försiktighetsåtgärderna som beskrivs i LIFECODES LSA-produktinformation (LC976CE).
- Slå på Luminex-instrumentet för att värmas upp i 30 minuter.
  - Ta ut LSA mikrosfärmix, C3d-positiva kontrollmikrosfärer (C3dPCB), C3d-komplementserum (C3dCS) och C3d-konjugat (C3dCJ) från frys i -65°C och förvara mörkt i rumstemperatur tills de tinat. När de har tinat lägg omedelbart produkterna på is och skydda de mot ljus.
  - Låt tvättbufferten komma upp i rumstemperatur (20 - 24°C) före bruk. Använd under tiden plattformbladet (LC979) för att tilldela en position på plattan för varje serum och kontroller som ska analyseras. **Negativa kontrollserum (medföljer LSA1- och LSA2-sats) används som negativ kontroll.**
  - Täck otilldelade behållare i filterplattan med ett vidhäftande plasticskydd. Förblöt fördjupningar som ska användas med 100-300 µL destillerat vatten. Efter 2 - 5 minuter, ta bort vattnet genom försiktig aspirering med vakuumpördelare (se tillverkarens rekommendationer för korrekt användning).
  - Bered LSA-mikrosfärer genom att kort (30 sekunder) centrifugera flaskan vid ~600 – 800 x g för att få bort mikrosfärer eller vätska från locket eller flaskans väggar. Virvla noga (~1 minut) för att jämnt resuspendera mikrosfärerna. Kombinera i en separat flaska 1 µL/prov med C3dPCB med lämplig volym LSA-mikrosfärer (40 µL/prov). Virvla (~1 minut) noga för att jämnt resuspendera mikrosfärerna.
  - Tillsätt 40 µL LSA mikrosfärmix med C3dPCB i varje tilldelad fördjupning. Virvla om LSA-mikrosfärflaskan varannan minut för att hålla mikrosfärerna suspenderade när mikrosfärerna fördelas. Centrifugera serumet (30 sekunder vid ~10 000 x g) och tillsätt 10 µL serum eller kontrollserum och blanda.

**FÖRSIKTIGHET:** Det är viktigt att hålla mikrosfärerna suspenderade för att tillräckligt många mikrosfärer ska alikvoterats i fördjupningarna och för att ge låga mikrosfärsantaltider. Om inte mikrosfärerna virvlas då och då lägger sig mikrosfärerna vid rörets botten. Då dispenserar olika många mikrosfärer, vilket kan påverka körtiderna och resultatanalysen negativt.

- Täck plattan med vidhäftande plasticskydd och täck med folie eller förpacka för att skydda mot ljus. Inkubera i 30 minuter i rumstemperatur (20-24°C) mörkt på en roterande plattform (200 varv i minuten). Ställ tillbaka oanvända mängder kontrollserum i förvaring i 2 - 8°C för senare bruk. Ställ tillbaka oanvända delar av LSA-mikrosfärmix och C3dPCB i förvaring i ≤-65°C mörkt för senare bruk.
- Efter 30 minuters inkubering, ta av det vidhäftande plasticskyddet och tillsätt 30 µL C3dCS i varje fördjupning, inklusive den negativa kontrollfördjupningen. Ställ **C3dCS i förvaring i ≤-65°C omedelbart före bruk**. Täck plattan med folie eller lägg i förpackning för att skydda produkten mot ljus. Lägg på en roterande plattform (ställ in på 200 varv i minuten) eller virvla var 5-10 minut. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (20 - 24°C).
- Efter 30 minuters inkubering, ta av det vidhäftande plasticskyddet och tillsätt 100 µL tvättbuffert i varje fördjupning. Blanda genom att knacka på plattans sida och försiktigt aspirera plattan.

**FÖRSIKTIGHET:** Är det för mycket vakuum, fastnar mikrosfärerna på membranet och provet kan misslyckas. Minsta möjliga vakuumptryck ska användas för att aspirera prov.

- Tillsätt 250 µL tvättbuffert i varje fördjupning, aspirera och upprepa tre gånger.

**FÖRSIKTIGHET:** Tvättas inte produkten helt kan konjugatets förmåga att detektera C3d som är bundet till antikropps-/antigenkomplex och orsaka falska negativa resultat.

- Centrifugera C3dCJ i 30 sekunder i mikrocentrifug (~600 – 800 x g). C3dCJ är bruksfärdigt. Spädning behövs inte. Tillsätt 50 µL C3dCJ i varje fördjupning. Förvara återstående C3dCJ vid 4°C i upp till tre månader eller förvara produkten i ≤-65°C fram till sista förbrukningsdatum.
- Täck plattan med folie eller lägg i förpackning för att skydda den mot ljus. Lägg på en roterande plattform (sätt på 200 varv per minut) eller virvla försiktigt var 5-10 minut. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur (20 - 24°C).
- Efter 30 minuters inkubation, ta av det vidhäftande plasticskyddet och tillsätt 100 µL tvättbuffert i varje fördjupning. Blanda genom att knacka på plattans sida och försiktigt aspirera plattan.
- Tillsätt 250 µL tvättbuffert i varje fördjupning och aspirera.
- Tillsätt 200 µL tvättbuffert med en ren pipettspets i varje fördjupning och blanda för att resuspendera mikrosfärerna.

16. Samla in data med Luminex-instrumentet enligt tillverkarens rekommendationer och **använd en Luminex C3d-mall (se LIFECODES LSA för partispecifik information)**. Förseningar på mer än 3 timmar vid rumstemperatur ökar risken för falska positiva eller falska negativa reaktioner. Förvara oanvänd tvättbuffert i 2 - 8°C för senare bruk.

## RESULTAT

---

**C3d-detektering:** Analysera resultatet för en provbatch enligt följande:

1. Skapa ett kalkylblad i Excel genom att öppna en kopia av ut-CSV-filen med resultat från Luminex-batchen och "Spara som" Excel-fil. Filen används till beräkningar för att analysera resultatet.
2. Från det partispecifika registreringsbladet som medföljer LSA-satsen, kopiera namnet på antigenen motsvarande varje mikrosfär.
3. Dra sedan ifrån MFI-värdena för det negativa kontrollserumet (MFI av NC-serum) från rå MFI för varje enskild mikrosfär för att beräkna bakgrundens justerade MFI (BG-justerad).

**(a) BG-justerad MFI = MFI hos ett prov – MFI av NC-serum**

4. Dela sedan BG-justerad MFI med MFI för beräknad kontroll (CalcCON) för respektive lokus för att få fram bakgrundens justerade förhållande (BCR-Neg). CalcCON för varje lokus är det råa MFI-värdet hos den lägst rankade antigenmikrosfären för den lokus.

**(b) BCR-neg =  $\frac{\text{BG-justerad MFI hos antigen}}{\text{Lägsta råa värde MFI hos lokus}}$**

5. Dividera till sist BG-justerad MFI hos antigen med motsvarande MFI-värde för antigenen för LSA negativt kontrollserum (NC) för att få fram relativ styrka (R-styrka).

**(c) R-styrka =  $\frac{\text{BG-justerad MFI hos antigen}}{\text{Råvärdes-MFI hos antigen}}$**

En mikrosfär anses positiv om två eller fler av de justerade värdena ligger över gränsvärdena. Se analysbeviset för C3d detekteringsprodukten (265400) för de positiva och negativa standardgränserna. Högre eller lägre känslighet fås fram genom att justera gränsvärdena.

## KVALITETSKONTROLL

---

Kvalitetskontroll för C3d-detektering är inbyggt i testsystemet genom inklusion av den positiva kontrollmikrosfären och det positiva och negativa kontrollserumet (medföljer LSA1- och LSA2-satsen). Dessa kontroller ska inkluderas i varje testkörning för att fastställa om tekniska fel eller reagensfel uppstått. Det positiva kontrollserumet kommer att reagera med många LSA-konjugerade mikrosfärer, för att skapa mönster som liknar det i C3d-detekteringsdiagrammet. Det negativa kontrollserumet kommer att reagera med bara några få eller inga alls LSA-konjugerade mikrosfärer.

Den C3d-positiva kontrollmikrosfären ska ge MFI-värden  $\geq 10\,000$  med en provanalys med det negativa kontrollserumet. Provvärden som är lägre än  $10\,000$  MFI kan tyda på att otillräckligt med C3dCJ har tillsatts, provanalysen rengjordes inte tillräckligt eller så har C3dCJ försämrats.

Antalet mikrosfärer måste vara minst 40 event.

## PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

---

Fel resultat kan uppkomma genom bakteriell kontaminering av testmaterial, otillräckliga inkuberingsperioder, otillräcklig rengöring eller dekantering av mikrosfärer, exponering av C3dCJ för strålning, eller utelämnande av testreagenser eller steg.

Immunkomplex eller andra immunglobulinaggregat i serumprovet kan orsaka ökad icke-specifik bindning och ge fel resultat i denna analys.

Serumantikroppstitrar är prov- och tidpunktsspecifika. Om många mikrosfärer ger MFI-värden på över  $15\,000$ , kan serum behöva späs.

På grund av HLA-testningens komplicerade art och att flera faktorer kan påverka komplementkaskaden som leder till bildandet av C3d, måste kvalificerad personal granska och tolka resultatet. Nyttjandet av kontrollserum och gränsvärden som avviker från de som anges i analysbeviset har inte validerats.

Testet här får inte användas som enda underlag vid kliniska beslut.

## FELSÖKNING

(se även LIFECODES LSA klass I och klass II - produktinformation LC976CE).

| FEL   | TÄNKBAR ORSAK                                       | LÖSNING   |
|---|---|---|
| Litet antal mikrosfärer endast för C3dPCB             | För få mikrosfärer tillsattes i LSA mikrosfärsmix   | Pulsvirvla för att helt resuspendera, undvik pipettering <3 µL, använd kalibrerade pipetter                         |
|   | Instrumentfel - felkalibrering                      | Se Luminex manual   |
|   | Fotoblekta mikrosfärer                              | Använd ny flaska med C3dPCB   |
| C3d positiv kontroll MFI-värden med serum <10 000 MFI | Fotoblekta eller för få C3dCJ tillsattes reaktionen | Upprepa analys.<br>Använd ny flaska med C3dCJ   |
|   | Otillräcklig rengöring                              | Upprepa analysen och övervaka rengöringen   |
| Lågt MFI för positivt kontrollserum                   | Fel prov tillsattes                                 | Upprepa provanalysen med rätt kontrollprov  |
|   | För lite C3dCJ tillsattes reaktionen                | Upprepa provanalysen med rätt mängd C3dCJ   |
|   | För lite C3dCS eller det tillsattes inte reaktionen | Upprepa provanalysen och tillsätt C3dCS   |
|   | Låg analystemperatur                                | Bekräfta att provanalysen utfördes vid 20°C-24°C. Försök med den högre temperaturen för högre MFI.                  |
| Anomalt mönster för positiva kontroll serum           | Fel prov tillsattes                                 | Upprepa provanalysen med rätt kontrollprov  |
|   | Otillräcklig rengöring                              | Upprepa provanalysen och övervakningen rengöringen  |
| Hög MFI för negativa kontrollserum (>1500 MFI)        | Otillräcklig rengöring                              | Upprepa provanalysen och övervaka rengöringen för att vara säker på att mikrosfärerna resuspenderas under rengöring |
|   |   | Minska vakuuum  |

## SPECIFIKA PRESTANDAEGENSKAPER

När LIFECODES C3d-detektion används enligt proceduren ovan visar resultatet närvaron eller frånvaron av komplement som är bundet till antikropps-/antigenkomplex.

En jämförelsestudie med 142 prov utfördes mellan LIFECODES C3d-detektion och komplementberoende cytotoxicitet (CDC). För denna uppsättning prov var känsligheten hos LIFECODES C3d-detektion bättre än CDC-test för detektion av komplementbindande HLA-antikropp i positiva serumprov som uppmätts i LIFECODES LSA klass I och klass II provanalyser.

## REFERENSER

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. Gierej, 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.

## TILLVERKARE

---

**Tillverkare:** Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, CT 06902 USA.

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

**Auktoriserad representant:** Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Adam-Opel-Strasse 26A, Rodermark 63322, Tyskland

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

**Teknisk support i Europa:** +32/3 385 47 91

**Publicerad:** Rev 0, 21 augusti 2015

