

Produktdokumentation und Übersetzungen erhältlich bei: www.immucor.com

PRODUKTBEILAGE

LIFECODES LSA™ Klasse I: Ein Luminex® Screening Assay zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern zu HLA Klasse I-Molekülen.

LIFECODES LSA™ Klasse II: Ein Luminex® Screening Assay für den qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern zu HLA Klasse II-Molekülen.

Für *in-vitro*-Diagnose

INHALTSVERZEICHNIS

Definition der Symbole	1	Gewinnung und Aufbereitung der Proben	3
Zweckbestimmung	2	Verfahren	3
Zusammenfassung und Erläuterung	2	A. Mitgelieferte Materialien.....	3
Verfahrensprinzipien	2	B. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien.....	3
Reagenzien	2	Gebrauchsanweisung	4
A. Identifizierung.....	2	Ergebnisse	5
B. Sicherheits- und Warnhinweise.....	3	Qualitätskontrolle	5
C. Anweisungen für die Aufbewahrung.....	3	Grenzen des Verfahrens	5
D. Reinigung bzw. Vorbereitung für den Gebrauch.....	3	Fehlersuche	6
E. Instabilitätshinweise	3	Besondere Leistungsmerkmale	6
Erforderliche Geräte	3	Literatur	6

DEFINITION DER SYMBOLE

(Produktetiketten und zusätzliche Dokumente)

Chargenbezeichnung LOT	Katalognummer REF	Verwendbar bis MFI - Schwellenwert	Lagertemperaturbereich 2°C - 8°C
Probe SAMPLE	Hersteller 	MFI TH	Lagertemperatur ≤ -65°C
Vor Gebrauch verdünnen DIL	Lichtempfindlich (vor Licht schützen) 	Ausreichend für N Ansätze 	Gebrauchsanweisung beachten
Name des Patienten NAME	Identifizierungsnummer ID#	Datum DATE	Techniker TECH
Bead BEAD	Klasse I CLI	Klasse II CLII	Trennpunkt CUT-OFF
Hintergrund BKG	Antigen AG	Mittlere Fluoreszenzintensität MFI	Auswertung INTRP
Negativkontroll-Bead NC	Positivkontroll-Bead (Immunoglobulin G) PC	Spendedatum BDT	Antigen-ID ANTIGEN ID
Antigen mit niedrigstem Stellenwert LRA	MFI / Antigen mit niedrigstem Stellenwert MFI/LRA	Warnung 	Beobachtete Grenzen OBSERVED LIMITS
Relative Antigenintensität RAD	Serologisches Äquivalent SERO		

ZWECKBESTIMMUNG

LIFECODES LSA™ Klasse I und Klasse II sind Bead-basierte Immunoassays zum qualitativen Nachweis von HLA IgG-Antikörpern.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Humane Leukozytenantigene (HLA) stellen ein System von Glykoproteinen dar, denen eine funktionelle Rolle bei der Präsentation von Peptiden an das Immunsystem zukommt.^{1,2} Als hochgradig polymorphes System können die HLA-Moleküle jedoch zum Ziel von Antikörperreaktionen beim Menschen während der Schwangerschaft, der Transfusion von Blutprodukten bzw. der Organabstoßung nach Transplantationen werden. Im Allgemeinen führt Alloimmunisation bei etwa 33 % der betroffenen Personen zur Produktion von HLA-Antikörpern.³ Das Vorhandensein bzw. das Fehlen dieser HLA-spezifischen Antikörper spielt eine Rolle bei der Bestimmung der Überlebensrate von Allotransplantaten.⁴

LIFECODES LSA™ Klasse I-Beads sind für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Glykoproteine der HLA Klasse I vorgesehen. LSA Klasse I besteht aus unterschiedlichen Luminex-Beads, zu denen gereinigte rekombinante Klasse I HLA-Glykoproteine konjugiert werden.

LIFECODES LSA™ Klasse II-Beads sind für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen HLA Klasse II-Glykoproteine vorgesehen. LSA Klasse II besteht aus unterschiedlichen Luminex-Beads, zu denen gereinigte rekombinante Klasse II HLA-Glykoproteine konjugiert werden.

VERFAHRENSPRINZIPIEN

Eine Teilprobe der Beads mit einer kleinen Menge Testserumprobe inkubieren lassen. Die sensibilisierten Beads werden anschließend gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wird ein Phycoerythrin-konjugierter antihumaner IgG-Antikörper beigefügt. Nach einer weiteren Inkubation wird die Testprobe verdünnt und auf dem Luminex-Gerät analysiert. Die Signalstärke von jedem Bead wird mit der Signalstärke des ortsspezifischen Beads mit dem niedrigsten Stellenwert verglichen, das in dem Beadpräparat enthalten ist, um zu bestimmen, ob das Bead positiv oder negativ für gebundene Alloantikörper ist.

REAGENZIEN

A. Identifizierung

265100: LSA1 LIFECODES LSA™ Klasse I besteht aus fünf (5) Komponenten in für 24 Tests ausreichenden Mengen.

- 265103 LSA1B LSA Klasse I Bead-Gemisch** (960 µl): Eine Mischung von Beads, von denen jedes mit einem anderen einzelnen Klasse I HLA-Glykoprotein konjugiert ist, plus Kontroll-Beads. Als Lagerungspuffer dient ein phosphatbasierter Puffer mit den Bestandteilen NaCl, Tween-20, Natriumazid und Rinderproteinen. LICHTEMPFLINDLICH. Regelmäßige Lichteinwirkung auf drei Stunden oder weniger beschränken. Bei ≤ -65 °C in Dunkeln aufbewahren.
- 265002 LSACJ LSA Konjugatkonzentrat** (120µl): Phycoerythrinkonjugiertes antihumanes Ziegen-IgG in einem phosphatbasierten Lagerungspuffer mit den Bestandteilen NaCl, Tween-20 und Natriumazid. **DIL** MUSS vor Gebrauch 1:10 in Waschpuffer VERDÜNNT WERDEN. LICHTEMPFLINDLICH. Längere direkte Lichteinwirkung vermeiden. Bei 2 bis 8 °C im Dunkeln aufbewahren.
- 628221 LMWB LIFECODES Waschpuffer** (30 ml): Ein phosphatbasierter Puffer mit NaCl, Tween-20, Natriumazid und Rinderserumalbumin. Bei 2 bis 8 °C lagern und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (20-24 °C) anwärmen.
- 265101 LSAPC1 LSA Klasse I Positivkontrolle** (100 µl): Dieses Serum- oder Serengemisch ist von Einzelpersonen entnommen, die nachweislich gegen HLA-Antigene alloimmunisiert sind; sie reagieren mit den meisten LSA Klasse I-Beads. Enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2 bis 8 °C aufbewahren.
- 265102 LSANC1 LSA Klasse I Negativkontrolle** (100 µl): Dieses Serum- oder Serengemisch ist von Einzelpersonen entnommen, die nachweislich über keine Antikörper gegen HLA-Antigene verfügen; sie reagieren mit wenigen oder gar keinen der LSA Klasse I-Beads. Enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2 bis 8 °C aufbewahren.

265200: LSA2 LIFECODES LSA™ Klasse II besteht aus fünf (5) Komponenten in für 24 Tests ausreichenden Mengen.

- 265203 LSA2B LSA Klasse II Bead-Gemisch** (960 µl): Eine Mischung von Beads, von denen jedes mit einem anderen einzelnen Klasse II HLA-Glykoprotein konjugiert ist, plus Kontroll-Beads. Als Lagerungspuffer dient ein phosphatbasierter Puffer mit den Bestandteilen NaCl, Tween-20, Natriumazid, Rinderproteinen. LICHTEMPFLINDLICH. Regelmäßige Lichteinwirkung auf drei Stunden oder weniger beschränken. Bei ≤ -65 °C in Dunkeln aufbewahren.
- 265002 LSACJ LSA Konjugatkonzentrat** (120 µl): Phycoerythrinkonjugiertes antihumanes Ziegen-IgG in einem phosphatbasierten Lagerungspuffer mit den Bestandteilen NaCl, Tween-20 und Natriumazid. **DIL** MUSS vor Gebrauch 1:10 in Waschpuffer VERDÜNNT WERDEN. LICHTEMPFLINDLICH. Längere direkte Lichteinwirkung vermeiden. Bei 2 bis 8 °C im Dunkeln aufbewahren.
- 628221 LMWB LIFECODES Waschpuffer** (30 ml): Ein phosphatbasierter Puffer mit NaCl, Tween-20, Natriumazid und Rinderserumalbumin. Bei 2 bis 8 °C lagern und vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (20-24 °C) anwärmen.
- 265201 LSAPC2 LSA Klasse II Positivkontrolle** (100 µl): Dieses Serum- oder Serengemisch ist von Einzelpersonen entnommen, die nachweislich gegen HLA-Antigene alloimmunisiert sind; sie reagieren mit den meisten LSA Klasse II-Beads. Enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2 bis 8 °C aufbewahren.
- 265202 LSANC2 LSA Klasse II Negativkontrolle** (100 µl): Dieses Serum- oder Serengemisch ist von Einzelpersonen entnommen, die nachweislich über keine Antikörper gegen HLA-Antigene verfügen; sie reagieren mit wenigen oder gar keinen der LSA Klasse II-Beads. Enthält 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2 bis 8 °C aufbewahren.

B. Sicherheits- und Warnhinweise

1. Für in-vitro-Diagnose.
2. Bei der Herstellung dieses Kits verwendetes Humanmaterial wurde getestet und mittels von der FDA (Überwachungsbehörde für Lebens- und Arzneimittel in den USA) anerkannten Methoden für negativ in Bezug auf Antikörper gegen HIV, HCV und HBsAG befunden. Keine Testmethode kann jedoch völlige Sicherheit dafür bieten, dass keinerlei infektiöse Keime präsent sind. Wenden Sie daher bei der Handhabung dieser Materialien **allgemeine Vorsichtsmaßnahmen** an.
3. Der Ersatz der in diesem System mitgelieferten Komponenten durch andere kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
4. Die Reagenzien enthalten 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel, welches mit in Abflussinstallationen verwendetem Blei oder Kupfer reagieren und explosive Metallazid-Verbindungen bilden kann. Beim Entsorgen der Stoffe über ein Spülbecken daher mit reichlich Wasser nachspülen.
5. Bakterielle Kontamination der Proben oder die Existenz von Immunkomplexen oder sonstigen Immunglobulinaggregaten kann zu erhöhter unspezifischer Bindung und zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
6. Mit diesem Produkt werden IgG-Antikörper nachgewiesen, die lymphozytotoxisch sein können oder auch nicht.
7. Dieses Produkt ist nicht zum Nachweis von Antikörpern der IgA- bzw. der IgM-Klasse der Immunglobuline bestimmt.
8. Die Feststellung des Vorhandenseins oder Fehlens von HLA ist keine ausreichende Grundlage für eine klinische Entscheidung bezüglich der Behandlung eines Patienten. Vor einer Transplantation wird routinemäßig ein letzter Verträglichkeitstest durchgeführt.
9. Diese Produkte sind für den Gebrauch mit dem Luminex-Gerät gemäß den Empfehlungen des Herstellers vorgesehen.
10. Sämtliche Materialien sind nach Gebrauch gemäß den lokal geltenden Vorschriften zu entsorgen.
11. Siehe zusätzliche Informationen im Sicherheitsdatenblatt.

C. Anweisungen für die Aufbewahrung

1. Die auf den Produktetiketten angegebenen Aufbewahrungshinweise beachten.
2. Beads und Konjugat sind LICHTEMPFLINDLICH. Routinemäßige Lichteinwirkung auf drei Stunden oder weniger beschränken.

D. Reinigung bzw. Vorbereitung für den Gebrauch

1. Siehe „Gewinnung und Aufbereitung der Proben.“
2. Konjugatkonzentrat muss vor Gebrauch 1:10 in Waschpuffer verdünnt werden.

E. Instabilitätshinweise

1. Komponenten bzw. Kontrollmaterialien, die eine Trübung aufweisen oder deren Verfallsdatum abgelaufen ist, dürfen nicht mehr verwendet werden.
2. Ungebrauchte verdünnte Positiv- und Negativkontrollen und Konjugate sind nach Gebrauch zu entsorgen.

ERFORDERLICHE GERÄTE

Luminex-Gerät und XY Plattform (Lifecodes Produktnummer 888300, 888302)

GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBEN

Blut sollte ohne Zusatz von Antikoagulanzen unter Verwendung der aseptischen Methode gewonnen und noch in frischem Zustand getestet werden, um die Gefahr von falsch-positiven bzw. falsch-negativen Reaktionen durch unsachgemäße Aufbewahrung oder Kontamination der Proben zu minimieren. Das Serum darf bei 2 bis 8 °C maximal 48 Stunden lang aufbewahrt werden. **Wenn Serum über 48 Stunden hinaus, für bis zu 2 Jahre, gelagert werden soll, muss es auf eine Temperatur von -20 °C oder darunter eingefroren werden.** Die einzelnen Laboratorien sollten Methoden zur Lagerung von Seren für mehr als 2 Jahre einrichten und validieren. Serum sollte während der Aufbewahrung oder beim Transport von roten Blutkörperchen getrennt gehalten werden. Wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen von Serumproben sollte vermieden werden.

Mikrobiell kontaminierte, hämolyzierte oder lipämische Seren können zu inkonsistenten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.

Vor dem Assay sollten alle Proben kurz gevortext und zentrifugiert werden (30 Sekunden bei 10.000 xg), um eventuell vorhandene Partikel zu pelletieren.

VERFAHREN

A. Mitgelieferte Materialien (zur genauen Information siehe REAGENZIEN auf Seite 2)

- LSA-Beads
- Konjugatkonzentrat
- Waschpuffer
- Positivkontrollserum
- Negativkontrollserum
- Aufzeichnungsblatt
- Plattenformatblatt

B. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, Reagenzien und Geräte (wie angegeben oder entsprechend)

- 5 µl – 50 µl verstellbare Pipetten mit geeigneten Pipettenspitzen
- 250 µl Mehrkanalpipette mit passenden Pipettenspitzen und Puffertrog
- 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen für Konjugatverdünnungen
- Reagenzglas für Patienten- und Kontrollproben
- Kurzzeitwecker
- Markierstift
- Millipore Multiscreen-Filterplatten (Millipore Kat.-Nr. MSBVN1210, MSBVN1250; Lifecodes Kat.-Nr. 888633 oder 888633-50)
- Multiscreen Vakuumpumpe (Millipore Kat.-Nr. MAVM 0960R, Qiagen Kat.-Nr. 19504, Lifecodes Kat.-Nr. 888315)
- Luminex Hüllstromflüssigkeit (Lifecodes Kat.-Nr. 628005)
- Luminex Kalibrierungskits (Luminex 100/200 Kalibrierungskit, Luminex 100/200 Leistungsverifizierungskit, Lifecodes Kat.-Nr. 628018 oder 628019)
- Destilliertes Wasser
- Drehplattform
- Adhäsive Plastikabdeckung (Corning Kat.-Nr. 6524 oder 6570)

GEBRAUCHSANWEISUNG

VORSICHTSMASSNAHMEN:

- Es MUSS sorgfältig darauf geachtet werden, dass eine Kontamination des Waschpuffers sowie des antihumanen IgG-Reagens vermieden wird. Versehentliche Kontamination dieser Reagenzien mit Humanserum führt zur Neutralisation des antihumanen IgG und zum Misslingen des Tests.
- Sorgfältige Regulierung der Vakuumstärke beachten. Übermäßiger Vakuumdruck kann dazu führen, dass Beads an der Membran kleben und Bead-Zählfehler verursachen.
- Während des Pipettierens in der Filterplatte sorgfältig vorgehen, so dass die Beads nicht an den Vertiefungen der Mikroplatten kleben bleiben. Die Beads sollten in die Vertiefung pipettiert werden, wobei sorgfältig darauf geachtet werden muss, dass die Membran dabei nicht mit der Spitze berührt wird. Bei Berührung der Membran mit der Pipettenspitze besteht die Gefahr, dass die Membranspitze durchstoßen wird und der Assay somit misslingt.
- Während der Inkubationen muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass die Beads nicht spritzen und an den Wänden der Vertiefungen kleben bleiben. Beim ersten Durchführen der Assays einige Positiv- und/oder Negativ-Kontrolldurchläufe durchführen, um die optimale Geschwindigkeit der Rotationsplattform bzw. für den Vortexmischer zu bestimmen. Eine Geschwindigkeit von etwa 200 Umdrehungen pro Minute **mit einer Umlaufbahn von 19 mm** hat sich bei einigen Geräten als wirkungsvoll erwiesen.
- Das Vorliegen signifikanter Mengen ungebundener Antikörper am Ende des Waschvorgangs, entweder durch ein Übermaß an Serum oder durch unzureichendes Waschen, kann die Tauglichkeit des Assays, an sensibilisierte Beads gebundenes IgG nachzuweisen, beeinträchtigen und zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Eine Probe positiver und negative Kontrollseren sollte Bestandteil aller Tests sein, um festzustellen, ob technische Fehler oder Versagen der Reagenzien vorliegen.
- **Die Probe wird mit 10 µL Serum (Protokoll 1) und 20 µL Serum (Protokoll 2) validiert.**

1. Nehmen Sie die LSA Bead-Mischung aus dem Gefrierschrank und bewahren Sie sie in einem dunklen Zimmer bei Zimmertemperatur auf, bis sie aufgetaut ist. Dann lagern Sie sie auf Eis und schützen Sie sie vor Lichteinwirkung. **Hinweis: Die Bead-Mischung kann ohne einen Verlust der unter „Verwendungszweck“ angegebenen Leistung maximal sechs Mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.**
2. Während die übrigen Komponenten weiterhin bei 2 bis 8 °C im Dunkeln gelagert werden, den Waschpuffer vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (20 bis 24 °C) anwärmen. In der Zwischenzeit das Plattenformat-Blatt verwenden, um jedem zu analysierenden Serum bzw. Kontrollserum eine Position auf der Platte zuzuweisen. Die im Kit mitgelieferten Kontrollseren werden verwendet, um ein breit reaktives positives Alloserum und ein negatives Serum zu illustrieren.
3. Die ohne Zuweisungen verbliebenen Vertiefungen der Filterplatte mit der adhäsiven Plastikabdeckung abdecken. Anschließend die benötigten Vertiefungen mit 100-300 µl destilliertem Wasser anfeuchten. Nach 2-5 Minuten das Wasser durch vorsichtiges Aspirieren der Platte mittels der Vakuumpumpe entfernen. (Siehe Empfehlungen des Herstellers für den korrekten Gebrauch.)
4. Die LSA-Beads kurz (30 Sekunden lang) durch Zentrifugieren des Röhrchens bei 600 – 800 xg aufbereiten, um Beads und Flüssigkeit vom Deckel oder von den Wänden des Röhrchens zu entfernen. Gründlich vortexen (~1 Minute), um die Beads gleichmäßig zu resuspendieren.
5. 40 µl LSA-Beads in jede der zugewiesenen Vertiefungen geben. **Das LSA-Bead-Röhrchen alle 2 Minuten erneut vortexen, um die Beads während der Verteilung suspendiert zu halten. Dann 10 µl Patientenserum und Kontrollseren (Protokoll 1) oder 20 µl Patientenserum und Kontrollseren (Protokoll 2) hinzufügen und mischen.**

VORSICHT: Es ist wichtig, die Beads resuspendiert zu halten, um sicherzustellen, dass ausreichend Beads in die Vertiefungen verteilt werden und um geringe Zählzeiten zu gewährleisten. Unzureichendes regelmäßiges Vortexen führt zum Absetzen der Beads am Boden des Röhrchens. Dadurch wird eine abweichende Menge von Beads in die Vertiefungen verteilt, was Durchlaufzeiten und Analyseergebnisse negativ beeinflussen kann.

6. Die Platte mit adhäsiver Plastikabdeckung verschließen und anschließend in Folie bzw. in eine Kiste packen, um sie vor Licht zu schützen. **30 Minuten lang bei Zimmertemperatur (20-24 °C) im Dunkeln auf einer Drehplattform inkubieren.** Nicht verwendete Anteile Kontrollseren für den künftigen Gebrauch bei 2 bis 8 °C wieder einlagern. Nicht verwendete Portionen LSA Bead-Mischung bei ≤ 65 °C für den künftigen Gebrauch im Dunkeln wieder einlagern.
7. Konjugat mit Waschpuffer verdünnen (5 µl Konjugat zu 45 µl Waschpuffer pro Probe). Zum Ausgleich von Pipettierverlusten ist es hilfreich, eine (1) zusätzliche Gabe von verdünntem Konjugat anzufertigen. Bis zur Verwendung mit Folie abdecken und/oder im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahren. Den nicht verwendeten Anteil Konjugatkonzentrat für den künftigen Gebrauch bei 2 bis 8 °C im Dunkeln wieder einlagern.
8. Nach der 30-minütigen Inkubation die adhäsive Plastikabdeckung entfernen und 100 µl Waschpuffer in jede Vertiefung geben. Serum vermischen, um die Beads zu resuspendieren, und Platte vorsichtig aspirieren.

VORSICHT: Übermäßiger Vakuumdruck kann dazu führen, dass Beads an der Membran kleben und Probenfehler verursachen. Den geringstmöglichen zum Aspirieren der Proben erforderlichen Vakuumdruck anwenden.

9. 250 µl Waschpuffer in jede Vertiefung geben, vermischen, um die Beads zu resuspendieren, aspirieren und zweimal wiederholen, um drei Waschgänge zu erhalten.

VORSICHT: Unzureichendes Waschen kann die Tauglichkeit des Konjugats, an sensibilisierte Beads gebundenes IgG nachzuweisen, beeinträchtigen und zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

10. 50 µl verdünnten Konjugats in jede Vertiefung geben. Die Platte mit Folie abdecken oder in eine Kiste packen, um sie vor Licht zu schützen. Auf eine rotierende Plattform stellen (eingestellt auf 200 Umdrehungen pro Minute) oder alle 5-10 Minuten vorsichtig vortexen. 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur (20 bis 24° C) inkubieren.
11. Unter Verwendung einer sauberen Pipettenspitze 130 - 150 µl Waschpuffer in jede Vertiefung geben und vermischen, um die Beads zu resuspendieren.
12. Mit dem Luminex-Gerät gemäß den Empfehlungen des Herstellers die Daten sammeln. Verzögerungen von mehr als 3 Stunden können die Gefahr erhöhen, falsch-positive bzw. falsch-negative Reaktionen zu erhalten. Den nicht verwendeten Anteil Waschpuffer für den künftigen Gebrauch bei 2 bis 8° C wieder einlagern.

ERGEBNISSE

Tragen Sie den durchschnittlichen Fluoreszenzintensität-Rohwert (MFI) für jedes Bead in das chargenspezifische Arbeitsblatt ein.

Zur Feststellung, ob ein Bead positiv ist, zunächst prüfen, ob die MFI für jedes einzelne Bead über der MFI-Schwelle auf dem chargenspezifischen Arbeitsblatt liegt, das im Kit enthalten ist. Übersteigt ein antigengebundenes Bead die MFI-Schwelle, teilen Sie die MFI durch die MFI des Antigens mit niedrigstem Stellenwert (LRA) seines jeweiligen Locus, um das Verhältnis von MFI und Antigen mit niedrigstem Stellenwert (MFI/LRA-Verhältnis) zu ermitteln. Das LRA für jedes Locus ist der MFI-Wert des Antigen-Beads mit geringstem Stellenwert für den jeweiligen Locus.

Beispiel: $\frac{\text{Individuelle Bead MFI}}{\text{LRA MFI für Locus "1"}} = \text{MFI/LRA für Antigen "x" von Locus "1"}$

$\frac{\text{Individuelles Bead MFI}}{\text{LRA MFI für Locus "2"}} = \text{MFI/LRA für Antigen "y" von Locus "2"}$

$\frac{\text{Individuelles Bead MFI}}{\text{LRA MFI für Locus "3"}} = \text{MFI/LRA für Antigen "z" von Locus "3"}$

Siehe das im Kit enthaltene, chargenspezifische Arbeitsblatt. Es enthält die Liste der auf jedem Bead vorhandenen Antigene und den Trennpunkt zur Bestimmung des positiven/negativen Resultats für jedes antigengebundene Bead. Ein antigengebundenes Bead gilt als positiv, wenn der MFI-Wert über der MFI-Schwelle und das MFI/LRA-Verhältnis über dem Trennpunkt liegt.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Qualitätskontrolle der LSA Klasse I und Klasse II ist durch Einbeziehung eines positiven und eines negativen Kontrollserums in das Testsystem enthalten. Diese Kontrollen sollten Bestandteil aller Tests sein, um festzustellen, ob technische Fehler oder Versagen der Reagenzien vorliegen. Die positiven Kontrollseren reagieren mit einer großen Zahl von HLA-konjugierten Beads und erstellen ein Muster, das dem auf dem chargenspezifischen Arbeitsblatt ähnelt. Die negativen Kontrollseren werden mit nur wenigen reagieren, wenn eines der konjugierten HLA-Beads MFI Werte ≤ 1000 MFI generiert.

Die Bead-Sets enthalten Kontroll-Beads, mit deren Hilfe die Leistung jeder Probe kontrolliert wird. Das Positivkontroll-Bead ist mit Human-IgG beschichtet und sollte mit den Kontrollseren MFI-Werte von ≥ 10.000 ergeben. Sollten Sie mit den Kontrollseren Werte von unter 10.000 MFI erhalten, ist Ihr Assay möglicherweise nicht ausreichend gewaschen oder Ihr Konjugat ist beeinträchtigt. Patientenproben weisen eine breite Auswahl an Reaktivität mit dem positive Kontroll-Bead auf, sollten jedoch ein Signal von ≥ 10.000 MFI erzeugen. Das negative Kontroll-Bead sollte niedrige MFI-Werte mit den Kontrollseren aufweisen. Siehe das chargenspezifische Arbeitsblatt für die beobachteten Grenzwerte für Kontroll-Beads mit Kontrollseren.

Die Assays müssen entsprechend den Empfehlungen in der Packungsbeilage und unter Einhaltung aller vorgeschriebenen Qualitätskontrollverfahren entsprechend den Vorschriften der jeweiligen Zulassungsbehörden durchgeführt werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Fehlerhafte Ergebnisse können durch bakterielle Kontamination der Testmaterialien, unzureichende Inkubationszeiten, unzureichendes Waschen bzw. Abgießen der Beads, Einwirkung von Streulicht auf das Konjugat oder Weglassen von Testreagenzien oder -schritten auftreten.

Das Vorliegen von Immunkomplexen bzw. sonstigen Immunglobulinaggregaten in der Patientenprobe kann eine erhöhte unspezifische Bindung zur Folge haben und fehlerhafte Ergebnisse in diesem Assay verursachen.

Die durch LSA-Kits nachgewiesenen Antikörper sind diejenigen, welche innerhalb der Population verfügbarer, auf dem Aufzeichnungsblatt aufgelisteter Antigene reaktiv sind.

LIFECODES Single Antigen HLA-Klasse I und II-Glykoproteine wurden aus Zelllinien gewonnen, die einzelne HLA-Antigene repräsentieren.

Einige IgG mit niedriger Avidität oder niedrigem Titer, IgA, IgM und im Panel nicht enthaltene monospezifische Antikörper werden mit den LIFECODES Single Antigen-Assays nicht nachgewiesen.

Serum-Antikörper-Titer sind patienten- und zeitpunktspezifisch. Sollten viele Beads MFI-Werte von über 15.000 produzieren, ist es unter Umständen erforderlich, die Seren zu verdünnen, um die IgG-Antikörper besser nachweisen zu können.

Wegen der Komplexität des HLA-Testvorgangs sollte nur geschultes Personal mit der Überprüfung der Dateninterpretation betraut werden. Die Bestimmung der Antikörper-Spezifität mithilfe von LSA-Kits muss die Ergebnisse aller Beads berücksichtigen, einschließlich derjenigen, die an oder nahe dem Trennpunkt. Kenntnis der Patientengeschichte und Verstehen der kreuzreaktiven Gruppen kann bei der Zuordnung der Spezifität zu einem bestimmten Serum nützlich sein.

FEHLERSUCHE

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHE	ABHILFE
Niedrige Beadzahl	Bead-Mischung nicht ausreichend suspendiert	Pulsweise vortexen zum vollständigen Resuspendieren
	Geräteversagen – fehlerhafte Kalibrierung	Siehe Gerätehandbuch
	Geräteversagen – Probenfluss blockiert	Siehe Gerätehandbuch
	Lichtgeschädigte Beads	Neues Kit verwenden
Negatives Kontroll-Bead (NC) Schwellenwert mit Kontrollseren überschritten	Unzureichender Waschvorgang	Waschvorgang wiederholen und kontrollieren
	Falsche Probe hinzugefügt	Mit richtiger Kontrollprobe wiederholen
Positives Kontroll-Bead (PC) Schwellenwert mit Kontrollseren überschritten	Kompromitiertes Konjugat z. B. Lichtschädigung	Neues Kit verwenden
	Unzureichender Waschvorgang	Waschvorgang wiederholen und kontrollieren
	Falsche Probe hinzugefügt	Mit richtiger Kontrollprobe wiederholen
Positives Kontroll-Bead (PC) Schwellenwert mit Patientenprobe überschritten	Kompromitiertes Konjugat z. B. Lichtschädigung Unzureichender Waschvorgang	Neues Kit verwenden
Anormales Muster der Positivkontrollseren	Falsche Probe hinzugefügt	Mit der richtigen Kontrollprobe wiederholen
	Unzureichender Waschvorgang	Waschvorgang wiederholen und kontrollieren
Positive Zuordnung für negative Kontrollseren (>2 HLA konjugierte Beads) oder >1000 MFI.	Falsche Probe hinzugefügt	Mit richtiger Kontrollprobe wiederholen
	Unzureichender Waschvorgang	Waschvorgang wiederholen und kontrollieren, um sicherzustellen, dass die Beads während des Waschvorgangs resuspendiert werden Vakuumstärke verringern
	Kontaminierung von Bead-Mischung, Waschpuffer, Negativen Kontrollseren oder Konjugatkonzentrat mit positiver Probe	Neues Kit verwenden
Verstopfte Filterplatte	Partikelmasse in Probe	Probe ca. 5 Minuten bei 8.000 – 12.000xg zentrifugieren

BESONDERE LEISTUNGSMERKMALE

Bei Verwendung der LIFECODES LSA-Kits in Übereinstimmung mit dem beschriebenen Verfahren wird durch die Ergebnisse das Vorhandensein oder Fehlen von HAL-IgG-Antikörpern identifiziert. Die klinischen Tests verwendeten LABScreen Standard-Trennpunktwerte, bei denen Ergebnisse von >4 als positiv galten.

LSA Klasse I

Das LIFECODES LSA Klasse I Kit zeigte 93,7 % (93,4 %) Übereinstimmung für 151 Proben mit entsprechenden Antigenen, im Vergleich zu Resultaten, die unter Verwendung von LABScreen Einzel-Antigen HLA Klasse I- Combi, Kat. Nr. LS1A04 (einseitige 95 % niedrigere Vertrauensgrenze) erzielt wurden.

LSA Klasse II

Das LIFECODES LSA Klasse II Kit zeigte 90,5 % (89,9 %) Übereinstimmung für 150 Proben mit entsprechenden Antigenen, im Vergleich zu Resultaten, die unter Verwendung von LABScreen Einzel-Antigen HLA Klasse II- Gruppe 1, Kat. Nr. LS2A01 (einseitige 95 % niedrigere Vertrauensgrenze) erzielt wurden.

LITERATUR

1. Klein, J, Sato, A. The HLA System. N. Engl. J. Med. 2000; 343:702 and 343:782.
2. Parham, P. The Immune System. Garland Publishing, N.Y. and London. 2000; 55.
3. Rodey, GE. HLA Beyond Tears (2nd Edition). 2000; 163.
4. McKenna, RM; Takemoto, SK; Terasaki, PI. Anti-HLA Antibodies after Solid Organ Transplantation. Transplantation 2000; 69:319.

HERSTELLER UND BEVOLLMÄCHTIGTER VERTRETER

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

Telefon: : 855.IMMUCOR oder 777.225.8790 (international), Fax: +1-203-328-9599

Bevollmächtigter Vertreter: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32, D-63303 Dreieich, Deutschland

Telefon: +49 (0)6103 80560, Fax: +49 (0) 6103 8056199

Technischer Kundendienst Europa: +32/3 385 47 91

Herausgegeben: Rev 1, 2017-01-24

