

## ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

**LIFECODES LSA™ Τάξης I:** Το Luminex® είναι ένας προσδιορισμός διαλογής για την ποιοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG σε μόρια HLA Τάξης I.

**LIFECODES LSA™ Τάξης II:** Το Luminex® είναι ένας προσδιορισμός διαλογής για την ποιοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG σε μόρια HLA Τάξης II.

Για διαγνωστική χρήση In Vitro

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>Ορισμός συμβόλων.....</b>	<b>1</b>	<b>Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία.....</b>	<b>3</b>
<b>Προοριζόμενη χρήση.....</b>	<b>2</b>	<b>Διαδικασία.....</b>	<b>3</b>
<b>Περίληψη και εξήγηση.....</b>	<b>2</b>	A. Παρεχόμενα υλικά.....	<b>3</b>
<b>Αρχές της διαδικασίας.....</b>	<b>2</b>	B. Απαιτούμενα, αλλά όχι παρεχόμενα υλικά.....	<b>3</b>
<b>Αντιδραστήρια.....</b>	<b>2</b>	<b>Οδηγίες χρήσης.....</b>	<b>4</b>
A. Ταυτοποίηση.....	2	<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>5</b>
B. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	3	<b>Έλεγχος ποιότητας.....</b>	<b>5</b>
Γ. Οδηγίες αποθήκευσης.....	3	<b>Περιορισμοί της διαδικασίας.....</b>	<b>5</b>
Δ. Καθαρισμός ή επεξεργασία που απαιτείται για τη χρήση.....	3	<b>Αντιμετώπιση προβλημάτων.....</b>	<b>6</b>
E. Ενδείξεις αστάθειας.....	3	<b>Ειδικά χαρακτηριστικά απόδοσης.....</b>	<b>6</b>
<b>Απαιτήσεις εργαλείου.....</b>	<b>3</b>	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>6</b>

### ΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

(Ετικέτες προϊόντων και συμπληρωματικά έγγραφα)

Αριθμός Παρτίδας		Αριθμός καταλόγου		Ημερομηνία λήξης		Εύρος θερμοκρασιών (αποθήκευση)	
ΔΕΙΓΜΑ		Κατασκευαστής		Όριο Διάμεσης Έντασης Φθορισμού (MFI)		Θερμοκρασία (αποθήκευση)	
Αραίωση πριν από τη χρήση		Φωτοευαίσθητο (Να κρατηθεί μακριά από το φως)		Επαρκές για N δοκιμές		Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	
Όνομα ασθενούς		Αριθμός ταυτοποίησης		Ημερομηνία		Τεχνικός	
Σφαιρίδιο		Τάξης I		Τάξης II		Διακοπή	
Ιστορικό		Αντιγόνο		Διάμεση Ένταση Φθορισμού		Ερμηνεία	
Αρνητικό σφαιρίδιο ελέγχου		Θετικό σφαιρίδιο ελέγχου (Ανοσοσφαιρίνη G)		Ημερομηνία αιμοληψίας		Ταυτότητα Αντιγόνου	
Αντιγόνο χαμηλότερης κατάταξης		MFI Αντιγόνο χαμηλότερης κατάταξης		Προειδοποίηση		Τηρούμενα όρια	
Σχετική πυκνότητα αντιγόνου		Ορολογικό ισοδύναμο					

## ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το LIFECODES LSA™ Τάξης I και Τάξης II είναι ανοσοπροσδιορισμοί περιεκτικότητας με βάση τα σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων HLA IgG.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ

Τα αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLA) είναι ένα σύστημα γλυκοπρωτεϊνών που έχουν λειτουργικό ρόλο στην παρουσίαση των πεπτιδίων στο ανοσοποιητικό σύστημα.<sup>1,2</sup> Ωστόσο, ως ιδιαίτερα πολυμορφικό σύστημα, τα μόρια HLA μπορούν να αποτελέσουν στόχους των αποκρίσεων των αντισωμάτων σε άτομα κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης, μετάγγισης προϊόντων αίματος ή απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνων. Γενικά, η αλλοανοσοποίηση οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων HLA στο 33% περίπου των ατόμων που έχουν εκτεθεί.<sup>3</sup> Η παρουσία ή η απουσία αυτών των συγκεκριμένων αντισωμάτων HLA-παίζει ρόλο στον προσδιορισμό της επιβίωσης των αλλομοσχευμάτων των μεταμοσχεύσεων.<sup>4</sup>

Τα σφαιρίδια LIFECODES LSA™ Τάξης I έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση των αντισωμάτων IgG σε γλυκοπρωτεΐνες HLA Τάξης I. Το LSA Τάξης I αποτελείται από διαφορετικά σφαιρίδια Lumipex συζευγμένα με γλυκοπρωτεΐνες HLA τάξης I κεκαθαρμένης συγγένειας.

Τα σφαιρίδια LIFECODES LSA™ Τάξης II έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση των αντισωμάτων IgG σε γλυκοπρωτεΐνες HLA Τάξης II. Το LSA Τάξης II αποτελείται από διαφορετικά σφαιρίδια Lumipex συζευγμένα με γλυκοπρωτεΐνες HLA τάξης II κεκαθαρμένης συγγένειας.

## ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Ένα κλάσμα των σφαιριδίων επιτρέπεται να επωασθεί μαζί με ένα μικρό όγκο δείγματος δοκιμαστικού ορού. Τα ευαισθητοποιημένα σφαιρίδια στη συνέχεια θα εκπλυθούν για να απομακρυνθεί το μη συνδεδεμένο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα αντι-ανθρώπινο αντίσωμα IgG συζευγμένο με φυκοερυθρίνη. Έπειτα, από μία ακόμη επώαση, το δοκιμαστικό δείγμα αραιώνεται και αναλύεται στο εργαλείο Lumipex. Η ένταση του σήματος από κάθε σφαιρίδιο συγκρίνεται με την ένταση του σήματος του σφαιριδίου συγκεκριμένου χώρου χαμηλότερης κατάταξης που περιλαμβάνεται στο παρασκεύασμα σφαιριδίου για να προσδιορίσει εάν το σφαιρίδιο είναι θετικό ή αρνητικό για το συνδεδεμένο αλλοαντίσωμα.

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### A Ταυτοποίηση

**265100:** Το **LSA1** LIFECODES LSA™ Τάξης I αποτελείται από πέντε (5) συστατικά στοιχεία σε επαρκείς ποσότητες για 24 δοκιμές.

- 265103** **LSA1B** **LSA Τάξης I Μείγμα σφαιριδίων** (960 µL): Ένα μείγμα σφαιριδίων συζευγμένων με διαφορετική μοναδική γλυκοπρωτεΐνη HLA Τάξης I συν σφαιρίδια μάρτυρα. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης με βάση το φώσφορο περιέχει NaCl, Tween-20, αζίδιο νατρίου και βόειο πρωτεΐνες. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟ. Κρατήστε το προϊόν μακριά από την έκθεση στο φως για 3 ώρες ή λιγότερο. **Να φυλάσσεται σε θερμοκρασία ≤ -65°C σε σκοτεινό μέρος.**
- 265002** **LSACJ** **LSA Συμπύκνωμα συζεύγματος** (120µL): Αντί-ανθρώπινη IgG αίγα συζευγμένη με φυκοερυθρίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης με βάση το φώσφορο που περιέχει NaCl, Tween-20 και αζίδιο νατρίου. **DIL** ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΡΑΙΩΘΕΙ σε αναλογία 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης πριν από τη χρήση. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟ. Κρατήστε το προϊόν μακριά από την έκθεση στο φως για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. **Να φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C σε σκοτεινό μέρος.**
- 628221** **LMWB** **LIFECODES Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης** (30 mL): Ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με βάση το φώσφορο που περιέχει NaCl, Tween-20, αζίδιο του νατρίου και αλβουμίνη βόειου ορού. **Να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C και να ισοσταθμίζεται σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C) πριν από τη χρήση.**
- 265101** **LSAPC1** **LSA Τάξης I Ορός θετικού ελέγχου** (100 µL): Αυτός ο ορός ή το μίγμα ορών λαμβάνεται από άτομο(α) που αποδεικνύεται ότι δεν έχουν καθόλου αντισώματα στα αντιγόνα HLA. Και θα αντιδράσουν με τα περισσότερα σφαιρίδια του LSA Τάξης I. Περιέχει 0,1% αζίδιο νατρίου ως συντηρητικό. **Να φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C.**
- 265102** **LSANC1** **LSA Τάξης I Ορός αρνητικού ελέγχου** (100 µL): Αυτός ο ορός ή το μίγμα ορών λαμβάνεται από άτομο(α) που είναι γνωστό ότι δεν έχουν καθόλου αντισώματα στα αντιγόνα HLA. και θα αντιδράσουν με τα περισσότερα σφαιρίδια του LSA Τάξης I. Περιέχει 0,1% αζίδιο νατρίου ως συντηρητικό. **Να φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C.**

**265200:** Το **LSA2** LIFECODES LSA™ Τάξης II αποτελείται από πέντε (5) συστατικά στοιχεία σε επαρκείς ποσότητες για 24 δοκιμές.

- 265203** **LSA2B** **LSA Τάξης II Μείγμα σφαιριδίων** (960 µL): Ένα μείγμα σφαιριδίων συζευγμένων με διαφορετική μοναδική γλυκοπρωτεΐνη HLA Τάξης II συν σφαιρίδια ελέγχου. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης με βάση το φώσφορο περιέχει NaCl, Tween-20, αζίδιο νατρίου, βόειο πρωτεΐνες. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟ. Κρατήστε το προϊόν μακριά από την έκθεση στο φως για 3 ώρες ή λιγότερο. **Να φυλάσσεται σε θερμοκρασία ≤ -65°C σε σκοτεινό μέρος**
- 265010** **LSACJ** **LSA Συμπύκνωμα συζεύγματος** (120µL): Αντί-ανθρώπινη IgG αίγα συζευγμένη με φυκοερυθρίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης με βάση το φώσφορο που περιέχει NaCl, Tween-20 και αζίδιο νατρίου. **DIL** ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΡΑΙΩΘΕΙ σε αναλογία 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης πριν από τη χρήση. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟ. Κρατήστε το προϊόν μακριά από την έκθεση στο φως για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. **Να φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C σε σκοτεινό μέρος.**
- 628221** **LMWB** **LIFECODES Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης** (30 mL): Ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με βάση το φώσφορο που περιέχει NaCl, Tween-20, αζίδιο του νατρίου και αλβουμίνη βόειου ορού. **Να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C και να ισοσταθμίζεται σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C) πριν από τη χρήση.**
- 265201** **LSAPC2** **LSA Τάξης II Ορός θετικού ελέγχου** (100 µL): Αυτός ο ορός ή το μίγμα ορών λαμβάνεται από άτομο(α) που αποδεικνύεται ότι δεν έχουν καθόλου αντισώματα στα αντιγόνα HLA. Και θα αντιδράσουν με τα περισσότερα σφαιρίδια του LSA Τάξης II. Περιέχει 0,1% αζίδιο νατρίου ως συντηρητικό. **Να φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C.**
- 265202** **LSANC2** **LSA Τάξης II Ορός αρνητικού ελέγχου** (100 µL): Αυτός ο ορός ή το μίγμα ορών λαμβάνεται από άτομο(α) που είναι γνωστό ότι δεν έχουν καθόλου αντισώματα στα αντιγόνα HLA. και θα αντιδράσουν με τα περισσότερα σφαιρίδια του LSA Τάξης II. Περιέχει 0,1% αζίδιο νατρίου ως συντηρητικό. **Να φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C.**

## **B Προειδοποιήσεις ή προφυλάξεις**

1. Για διαγνωστική χρήση in vitro.
2. Το υλικό ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αυτού του kit δοκιμάστηκε και βρέθηκε αρνητικό για αντισώματα στους ιούς HIV, HCV, και HBsAg με μεθόδους εγκεκριμένες από την υπηρεσία FDA. Ωστόσο, καμία δοκιμαστική μέθοδος δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διασφάλιση ως προς την απουσία μολυσματικών παραγόντων. Επομένως, όταν εργάζεστε με αυτά τα υλικά, **να εφαρμόζετε τις Γενικές Προφυλάξεις**.
3. Η αντικατάσταση συστατικών στοιχείων με στοιχεία που δεν παρέχονται στο παρόν σύστημα μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
4. Τα αντιδραστήρια περιέχουν 0,1% αζίδιο νατρίου ως συντηρητικό, το οποίο μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μόλυβδου και χαλκού και να σχηματίσει εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Να χρησιμοποιείτε άφθονες ποσότητες νερού όταν απορρίπτετε υλικά στο νεροχύτη.
5. Η βακτηριακή μόλυνση των δειγμάτων ή η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή άλλου συνόλου ανοσογλοβουλίνης μπορεί να προκαλέσει αυξημένη μη συγκεκριμένη σύνδεση και λανθασμένα αποτελέσματα.
6. Το παρόν προϊόν ανιχνεύει αντισώματα IgG που μπορεί να είναι ή όχι λεμφοκυτταροτοξικά.
7. Το παρόν προϊόν δεν αναμένεται να ανιχνεύει αντισώματα ανοσογλοβουλίνης τάξης IgA ή IgM.
8. Ο καθορισμός της παρουσίας ή απουσίας των αντισωμάτων σε HLA δεν είναι η μοναδική βάση για μια κλινική απόφαση που επηρεάζει τη θεραπεία του ασθενή. Συνήθως πραγματοποιείται μία διασταύρωση πριν τη μεταμόσχευση.
9. Αυτά τα προϊόντα έχουν σχεδιαστεί για να χρησιμοποιηθούν με το εργαλείο Luminex σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
10. Απαλλαγείτε από όλα τα υλικά μετά τη χρήση σύμφωνα με τους εγχώριους κανονισμούς.
11. Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά Φύλλα δεδομένων ασφαλείας υλικού.

## **Γ Οδηγίες αποθήκευσης**

1. Ανατρέξτε στις επικέτες των προϊόντων για ενδείξεις αποθήκευσης.
2. Τα σφαιρίδια και το συμπυκνωμένο σύζευγμα είναι ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΑ. Κρατήστε το προϊόν μακριά από την έκθεση στο φως για 3 ώρες ή λιγότερο.

## **Δ Καθαρισμός ή επεξεργασία που απαιτείται για τη χρήση**

1. Ανατρέξτε στην ενότητα «Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία.»
2. Το συμπυκνωμένο σύζευγμα πρέπει να αραιωθεί σε αναλογία 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης πριν από τη χρήση.

## **Ε Ενδείξεις ασάφειας**

1. Μη χρησιμοποιείτε συστατικά ή μάρτυρες που παρουσιάζουν θολότητα ή έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης τους.
2. Απορρίψτε όλους τους θετικούς ή αρνητικούς μάρτυρες που δεν χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το σύζευγμα μετά τη χρήση.

## **ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟΥ**

Όργανο Luminex και Βάση XY (Lifecodes Αριθμός προϊόντος 888300, 888302)

## **ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ**

Το αίμα πρέπει να συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικό με ασηπτική τεχνική και να ελέγχεται όσο είναι ακόμη φρέσκο ώστε να ελαχιστοποιήσει την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων λόγω ακατάλληλης αποθήκευσης ή μόλυνσης του δείγματος. Ο ορός πρέπει να αποθηκεύεται σε θερμοκρασία από 2 έως 8°C για 48 ώρες το πολύ. Εάν ο ορός πρέπει να αποθηκευθεί πάνω από 48 ώρες, θα πρέπει να καταψυχθεί στους ή κάτω από -20 °C έως 2 χρόνια. Επιμέρους εργαστήρια θα πρέπει να καθορίζουν και επικύρωση μεθόδων για την αποθήκευση ορού για περισσότερο από 2 χρόνια. Ο ορός πρέπει να διαχωρίζεται από τα ερυθροκύτταρα όταν αποθηκεύεται ή μεταφέρεται. Αποφύγετε την επανειλημμένη ψύξη και απόψυξη των δειγμάτων ορού.

Μη χρησιμοποιείτε μικροβιολογικά μολυσμένους, αιμολυμένους, λιπαιμικούς ή απενεργοποιημένους με θερμότητα ορούς καθώς αυτά τα δείγματα ενδέχεται να δώσουν αντιφατικά αποτελέσματα.

Πριν τον προσδιορισμό, όλα τα δείγματα πρέπει να αναμειχθούν για λίγο με δονητικό αναδευτήρα (30 δευτερόλεπτα σε 10.000xg) για να ιζηματοποιηθεί κάθε σωματίδιο που ενδέχεται να υπάρχει.

## **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **A. Παρεχόμενα υλικά (βλ. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ στη σελίδα 23 για πιο συγκεκριμένες πληροφορίες)**

- Σφαιρίδια LSA
- Συμπύκνωμα συζεύγματος
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
- Ορός θετικού μάρτυρα
- Ορός αρνητικού μάρτυρα
- Φύλλο καταγραφής
- Φύλλο μορφής πλάκας

### **B. Υλικά, αντιδραστήρια και απαιτούμενος αλλά μη παρεχόμενος εξοπλισμός (αυτά που αναφέρονται ή ισοδύναμα)**

- Προσαρμοζόμενες πιπέτες 5 μL – 50 μL με κατάλληλες απολήξεις
- Πολυκανάλι πιπέτα 250 μL με κατάλληλες απολήξεις και δοχείο ρυθμιστικού διαλύματος
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 1,5 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες για δείγματα ασθενών και μαρτύρων
- Χρονόμετρο
- Πένα επισήμανσης
- Μικροπορώδεις πλάκες πολλαπλού φιλτραρίσματος (Αρ. Κατ. MSBVN1210 ή MSBVN1250, LifeCodes Αρ. Κατ. 888633 ή 888633-50)
- Πολλαπλός συλλέκτης κενού (Millipore Αρ. Κατ. #MAVM 0960R ή Qiagen Αρ. Κατ.#19504, Lifecodes Αρ. Κατ. 888315)
- Υγρό ελύτρου Luminex (Lifecodes Αρ. Κατ. 628005)
- Kit Βαθμονόμησης Luminex (Kit Βαθμονόμησης Luminex 100/200, Kit Επαλήθευσης Απόδοσης Luminex 100/200, Lifecodes Αρ. Κατ. 628018 και 628019 αντιστοίχως)
- Αποσταγμένο νερό
- Περιστροφικής πλατφόρμας
- Αυτοκόλλητα πλαστικά καλύμματα (Corning Αρ. Κατ. 6524 ή 6570)

## ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

### ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

- ΠΡΕΠΕΙ να δοθεί προσοχή ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης και του αντιδραστήριου αντι-ανθρώπινου IgG. Η ακούσια μόλυνση αυτών των αντιδραστηρίων με ανθρώπινο ορό θα έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της αντι-ανθρώπινης IgG και την επακόλουθη αποτυχία της δοκιμής.
- Πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να ελέγχεται η ισχύς του κενού. Η ισχυρή πίεση κενού μπορεί να κάνει τα σφαιρίδια να κολλήσουν στη μεμβράνη με αποτέλεσμα να αποτύχει η μέτρηση των σφαιριδίων.
- Πρέπει να δοθεί προσοχή κατά το πιπετάρισμα στην πλάκα του φίλτρου ώστε τα σφαιρίδια να μην κολλήσουν στην πλευρά των φρεατίων της μικροπλάκας. Τα σφαιρίδια πρέπει να μεταφέρονται με πιπέτα μέσα στο διάλυμα που ήδη βρίσκεται στο φρεάτιο, ενώ πρέπει να προσέχετε να μην ακουμπήσετε τη μεμβράνη με την απόληξη. Η επαφή της μεμβράνης με την απόληξη της πιπέτας μπορεί να προκαλέσει διάτρηση της μεμβράνης και επακόλουθη αποτυχία του προσδιορισμού.
- Πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε να διασφαλιστεί, κατά τα βήματα της επώασης, ότι τα σφαιρίδια δε θα προκαλέσουν στο υγρό να χυθεί και δεν θα κολλήσουν στις πλευρές των φρεατίων. Όταν ο προσδιορισμός εκτελείται για πρώτη φορά, αναλύστε μερικούς θετικούς ή και αρνητικούς μάρτυρες για να καθορίσετε τη βέλτιστη ταχύτητα της περιστροφικής πλατφόρμας ή του δονητικού αναδευτήρα. Η ταχύτητα των 200 περιστροφών ανά λεπτό περίπου με μέγεθος τροχιάς 19mm έχει αποδειχτεί αποτελεσματική σε μερικά εργαλεία.
- Η παρουσία σημαντικών επιπέδων μη συνδεδεμένου αντισώματος, λόγω είτε υπερβολικού ορού είτε ανεπαρκούς έκπλυσης, μπορεί να μειώσει την ικανότητα του προσδιορισμού να ανιχνεύει IgG που έχει συνδεθεί με ευαισθητοποιημένα σφαιρίδια και να προκαλέσει λανθασμένα αποτελέσματα.
- Ένα δείγμα θετικών και αρνητικών ορών ελέγχου πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε δοκιμή για να βοηθήσει να διαπιστώνονται τα τεχνικά σφάλματα ή οι αποτυχίες των αντιδραστηρίων.
- Ο προσδιορισμός επικυρώνεται με ορό 10μL (Πρωτόκολλο 1) και ορό 20μL (Πρωτόκολλο 2).

1. Βγάλτε το Μείγμα σφαιριδίων LSA από την κατάψυξη και αποθηκεύστε το σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου αποψυχθεί. Έπειτα, τοποθετήστε το στον πάγο και προστατεύστε το από την έκθεση στο φως. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το μείγμα σφαιριδίων μπορεί να ψυχθεί και να αποψυχθεί το πολύ 6 φορές χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του, όπως υποδεικνύεται στην Προοριζόμενη χρήση..**
2. Αφήνοντας τα άλλα συστατικά στους 2 έως 8°C σε σκοτεινό μέρος έως ότου τα χρειαστείτε, αφήστε το Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου (20 έως 24°C) πριν από τη χρήση. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, χρησιμοποιήστε το Φύλλο μορφής πλάκας για να εκχωρήσετε μια θέση στην πλάκα για καθέναν από τους ορούς και τους μάρτυρες που πρόκειται να αναλυθούν. Οι οροί ελέγχου που παρέχονται με το kit χρησιμοποιούνται στην απεικόνιση ενός ευρέως αντιδραστικού θετικού αλλοορού και ενός αρνητικού ορού.
3. Καλύψτε τα μη εκχωρημένα φρεάτια της Πλάκας φίλτρου με αυτοκόλλητο πλαστικό κάλυμμα. Έπειτα, προϋγράνετε τα φρεάτια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν με 100-300 μL απεσταγμένου νερού. Μετά από 2-5 λεπτά, αφαιρέστε το νερό με απαλή αναρρόφηση χρησιμοποιώντας πολλαπλό κενό. (Βλ. Τις συστάσεις του κατασκευαστή για την κατάλληλη χρήση του προϊόντος.)
4. Ετοιμάστε σύντομα τα Σφαιρίδια HLA (30 δευτερόλεπτα) με φυγοκέντρηση του φιαλιδίου στα 600 – 800 x g για να αφαιρέσετε τυχόν σφαιρίδια ή υγρό από το καπάκι ή τα τοιχώματα του φιαλιδίου. Αναμίξτε επιμελώς με δονητικό αναδευτήρα (~1 λεπτό) για να τοποθετηθούν (αιωρηθούν) ομοιόμορφα τα σφαιρίδια.
5. Προσθέστε 40 μL σφαιριδίων LSA σε κάθε φρεάτιο δοκιμής της πλάκας φίλτρου. Αναμίξτε ξανά τα σφαιρίδια LSA στο φιαλίδιο κάθε 2 λεπτά για να διατηρούνται σε κατάσταση αιώρησης κατά τη διανομή τους, και προσθέστε κατόπιν 10 μL από τον ορό ασθενούς και τον ορό ελέγχου (Πρωτόκολλο 1) ή 20 μL από τον ορό ασθενούς και τον ορό ελέγχου (Πρωτόκολλο 2) και αναμίξτε.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Είναι σημαντικό να διατηρείτε τα σφαιρίδια σε κατάσταση επαναιώρησης για να διασφαλίσετε ότι μοιράζονται αρκετά σφαιρίδια στα φρεάτια και να διασφαλίσετε χαμηλούς χρόνους καταμέτρησης. Αν δεν αναμειγνύονται κατά διαστήματα τα σφαιρίδια σε δονητικό αναδευτήρα, τα σφαιρίδια θα εγκατασταθούν κοντά στον πυθμένα του σωληναρίου. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την τοποθέτηση διαφορετικών ποσοτήτων σφαιριδίων στα φρεάτια, γεγονός το οποίο ενδέχεται να έχει αρνητική επίδραση στους χρόνους εκτέλεσης και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

6. Καλύψτε την πλάκα με αυτοκόλλητο πλαστικό κάλυμμα και έπειτα, περικαλύψτε την ή συσκευάστε την σε κουτί για να προστατευτεί από το φως. Επώαστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C) σε σκοτεινό μέρος σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα. Επιστρέψτε την ποσότητα των ορών ελέγχου και σφαιριδίων που δεν έχει χρησιμοποιηθεί προς αποθήκευση στους 2 έως 8°C για μελλοντική χρήση. Επιστρέψτε την ποσότητα του μείγματος σφαιριδίων LSA που δεν έχει χρησιμοποιηθεί προς αποθήκευση στους ≤ 65°C για μελλοντική χρήση.
7. Αραιώστε το σύζευγμα με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και φυλάξτε το σε σκοτεινό μέρος (5 μL συζεύγματος σε 45 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά δείγμα). Για να αντισταθμίσετε τις απώλειες του πιπεταρίσματος, μπορείτε να ετοιμάσετε ένα (1) πρόσθετο μέρος αραιωμένου συζεύγματος. Περικαλύψτε ή και αποθηκεύστε σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιήσετε το προϊόν. Επιστρέψτε την ποσότητα Συμπυκνωμένου συζεύγματος που δεν έχει χρησιμοποιηθεί προς αποθήκευση στους 2 έως 8°C σε σκοτεινό μέρος για μελλοντική χρήση.
8. Μετά από επώαση 30 λεπτών αφαιρέστε το αυτοκόλλητο πλαστικό κάλυμμα και προσθέστε 100 μL Ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε κάθε φρεάτιο. Αναμίξτε για να αιωρηθούν ξανά τα σφαιρίδια και αναρροφήστε απαλά την πλάκα.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η χρήση υπερβολικής ισχύος κενού θα κάνει τα σφαιρίδια να προσκολληθούν στη μεμβράνη και ενδέχεται να προκαλέσουν την αποτυχία του δείγματος. Εφαρμόστε την ελάχιστη πίεση κενού που απαιτείται για την αναρρόφηση των δειγμάτων.

9. Προσθέστε 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε κάθε φρεάτιο, αναμίξτε για να αιωρηθούν ξανά τα σφαιρίδια, αντλήστε, και επαναλάβετε άλλες δύο φορές για τρεις συνολικά εκπλύσεις.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η ανεπαρκής πλύση μπορεί να μειώσει την ικανότητα του συζεύγματος να ανιχνεύει IgG που έχει συνδεθεί με ευαισθητοποιημένα σφαιρίδια και να προκαλέσει λανθασμένα αρνητικά αποτελέσματα.

10. Προσθέστε 50 μL αραιωμένου συζεύγματος σε κάθε φρεάτιο. Περικαλύψτε την πλάκα ή συσκευάστε σε κουτί για να το προστατεύσετε από το φως. Τοποθετήστε σε περιστρεφόμενη πλατφόρμα (ρυθμίστε στις 200 περιστροφές ανά λεπτό) ή αναμίξτε απαλά με δονητικό αναδευτήρα κάθε 5-10 λεπτά. Επώαστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 24°C).
11. Χρησιμοποιώντας μία καθαρή απόληξη πιπέτας, προσθέστε 130 - 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε κάθε φρεάτιο και αναμίξτε για να αιωρηθούν εκ νέου τα σφαιρίδια.
12. Συλλέξτε δεδομένα με το εργαλείο Lumiplex ακολουθώντας τις συστάσεις του κατασκευαστή. Καθυστερήσεις μεγαλύτερες από 3 ώρες μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων. Επιστρέψτε την ποσότητα Ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης που δεν έχει χρησιμοποιηθεί προς αποθήκευση στους 2 έως 8°C για μελλοντική χρήση.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καταχωρίστε τις τιμές του Ακατέρηστου Όρου Διάμεσης Έντασης Φθορισμού (MFI) για κάθε σφαιρίδιο στο Φύλλο Καταγραφής παρτίδας. Για να καθορίσετε εάν ένα σφαιρίδιο είναι θετικό, καθορίστε πρώτα εάν το MFI για κάθε σφαιρίδιο που συνδέεται με αντιγόνο βρίσκεται άνω του ορίου MFI στο Φύλλο Καταγραφής παρτίδας που παρέχεται με το kit. Εάν ένα σφαιρίδιο που συνδέεται με αντιγόνο βρίσκεται άνω του ορίου MFI, διαιρέστε το MFI δια το MFI του Αντιγόνου Χαμηλότερης Κατάταξης (LRA) της συγκεκριμένης του περιοχής για να δημιουργήσετε την αναλογία MFI/Αντιγόνου Χαμηλότερης Κατάταξης (MFI/LRA). Το LRA για κάθε χώρο είναι η τιμή MFI του σφαιριδίου αντιγόνου χαμηλότερης κατάταξης για αυτόν τον χώρο.

Παράδειγμα :  $\frac{\text{MFI Ατομικού Σφαιριδίου}}{\text{LRA MFI για θέση "1"}} = \text{MFI/LRA για αντιγόνο "x" από τη θέση "1"}$

$\frac{\text{MFI Ατομικού Σφαιριδίου}}{\text{LRA MFI για θέση "2"}} = \text{MFI/LRA για αντιγόνο "y" από τη θέση "2"}$

$\frac{\text{MFI Ατομικού Σφαιριδίου}}{\text{LRA MFI για θέση "3"}} = \text{MFI/LRA για αντιγόνο "z" από τη θέση "3"}$

Ανατρέξτε στο ειδικό για την παρτίδα φύλλο καταγραφής που συνοδεύει το kit για τη λίστα αντιγόνων που είναι παρόντα σε κάθε σφαιρίδιο και τη διακοπή για τον καθορισμό θετικού/αρνητικού αποτελέσματος με κάθε σφαιρίδιο που συνδέεται με αντιγόνο. Ένα σφαιρίδιο που συνδέεται με αντιγόνο θεωρείται θετικό εάν η τιμή MFI είναι μεγαλύτερη από το Όριο MFI και η αναλογία MFI/LRA είναι μεγαλύτερη από την τιμή διακοπής.

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο έλεγχος ποιότητας LSA Τάξης I και Τάξης II περιλαμβάνεται μέσα στο τεστ του συστήματος και περιλαμβάνει Θετικό και Αρνητικό ορό ελέγχου. Αυτοί οι οροί ελέγχου πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε δοκιμή για να διαπιστώνονται τα τεχνικά σφάλματα ή οι αποτυχίες των αντιδραστηρίων. Ο Ορός Θετικού Ελέγχου θα αντιδράσει με μεγάλο αριθμό συζευγμένων σφαιριδίων HLA δημιουργώντας ένα σχέδιο παρόμοιο με το Φύλλο Καταγραφής της παρτίδας. Ο Ορός Αρνητικού Ελέγχου θα είναι αρνητικός και θα αντιδράσει με λίγα εάν κανένα από τα συζευγμένα σφαιρίδια HLA παράγοντας τιμές  $\leq 1000$  MFI.

Τα σετ σφαιριδίων περιλαμβάνουν σφαιρίδια ελέγχου για την παρακολούθηση της απόδοσης κάθε δείγματος. Το Θετικό σφαιρίδιο ελέγχου είναι επιστρωμένο με ανθρώπινη IgG και πρέπει να εμφανίσει τιμές MFI  $\geq 10.000$  με τους ορούς ελέγχου. Εάν παίρνετε τιμές χαμηλότερες από 10.000 MFI με τους ορούς ελέγχου, ο προσδιορισμός σας μπορεί να έχει εκπλυθεί ανεπαρκώς ή το σύζευγμα μπορεί να είναι ακατάλληλο. Τα δείγματα ασθενούς δείχνουν ευρύ εύρος αντιδραστικότητας με το Σφαιρίδιο Θετικού Ελέγχου, αλλά πρέπει να παράγουν ένα σήμα  $\geq 10.000$  MFI. Το Σφαιρίδιο Αρνητικού Ελέγχου πρέπει να δείχνει χαμηλές τιμές MFI με τον ορό ελέγχου. Ανατρέξτε στο ειδικό φύλλο καταγραφής παρτίδας για τα τηρούμενα όρια των σφαιριδίων ελέγχου με ορό ελέγχου.

Η δοκιμασία πρέπει να εκτελεστεί όπως συνιστάται στο εσωτερικό της συσκευασίας καθώς επίσης όπως εκτελείται με κάθε άλλη διαδικασία ποιοτικού ελέγχου που συμφωνεί με τις τοπικές απαιτήσεις και τις απαιτήσεις της πολιτείας, της ομοσπονδίας ή / και των υπηρεσιών διαπίστευσης.

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Μπορεί να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα λόγω βακτηριακής μόλυνσης των υλικών ελέγχου, ακατάλληλων χρόνων επώασης, ακατάλληλης έκπλυσης σφαιριδίων, έκθεσης του συζεύγματος στο φως ή παράλειψης αντιδραστηρίων ή βημάτων της δοκιμής.

Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή άλλου συνόλου ανοσογλοβουλίνης στον ορό ασθενή μπορεί να προκαλέσει αυξημένη μη ειδική σύνδεση και λανθασμένα αποτελέσματα στον παρόν προσδιορισμό.

Τα αντισώματα που ανιχνεύονται είναι εκείνα που αντιδρούν μέσα στον πληθυσμό των διαθέσιμων αντιγόνων που είναι καταχωρημένα στο Φύλλο καταγραφής.

Τα Μονά αντιγόνα HLA Τάξης I και οι γλυκοπρωτεΐνες Τάξης II LIFECODES αποκτήθηκαν από τις γραμμές κυττάρων που εκφράζουν μονά αντιγόνα HLA.

Μερικά χαμηλής σχέσης, μερικά χαμηλής πιλοδότησης, IgA, IgM και αντισώματα έναντι σπανίων αλληλόμορφων δεν θα ανιχνευθούν με τους προσδιορισμούς Μονών αντιγόνων LIFECODES.

Οι τίτλοι ορού αντισωμάτων χρειάζονται υπομονή και συγκεκριμένο χρόνο. Εάν πολλά σφαιρίδια παράγουν τιμές MFI πάνω από 15.000, ίσως χρειαστεί να αραιώσετε τον ορό για καλύτερη ανίχνευση των αντισωμάτων IgG.

Λόγω της σύνθετης φύσης της εξακρίβωσης HLA, η ερμηνεία των δεδομένων πρέπει να εκτελείται από εξειδικευμένο προσωπικό. Η εξακρίβωση της αντιδραστικότητας των αντισωμάτων με χρήση των kit LSA πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα αποτελέσματα όλων των σφαιριδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που ενδέχεται να βρίσκονται στην τιμή διακοπής. Η γνώση του ιστορικού του ασθενούς καθώς και η κατανόηση των ομάδων με διασταυρωμένες αντιδράσεις μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες στην εκχώρηση αντιδραστικότητας αντισωμάτων σε συγκεκριμένο ορό.

## ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
Χαμηλός αριθμός σφαιριδίων	Το μείγμα ιχνηλατών δεν έχει εναιωρηθεί καλά.	Χρησιμοποιήστε το δονητικό αναδευτήρα για να εναιωρηθεί ξανά πλήρως
	Αποτυχίες εργαλείου – εκτός βαθμονόμησης	Βλ. εγχειρίδιο εργαλείου
	Αποτυχίες εργαλείου – η ροή του δείγματος είναι φραγμένη	Βλ. εγχειρίδιο εργαλείου
	Φωτολεύκανση σφαιριδίων	Χρησιμοποιήστε νέο κιτ
	Πίεση κενού υπερβολικά ισχυρή/σφαιρίδια προσκολλημένα στη μεμβράνη	Μειώστε την ισχύ του κενού, Οι μικροπορώδεις πλάκες πολλαπλού φίλτραρίσματος συνιστούν ένα κενό 271-406 χιλιοστόβαρο (8-12 ίντσες Υδράργυρος)
Σφαιρίδιο Αρνητικού Ελέγχου (NC) Υπέρβαση Ορίου με Ορό Ελέγχου	Ανεπαρκής έκπλυση	Επαναλαμβάνετε και παρακολουθείτε τις εκπλύσεις
	Προστέθηκε λάθος δείγμα	Επαναλαμβάνετε με το σωστό δείγμα ελέγχου
Σφαιρίδιο Θετικού Ελέγχου (PC) Αποτυχία ορίου με Ορό Ελέγχου	Διακυβευμένο συζευκτικό, π.χ., φωτολεύκανση	Χρησιμοποιήστε καινούργιο κιτ
	Ανεπαρκής έκπλυση	Επαναλάβετε και παρακολουθήστε τις εκπλύσεις
	Προστέθηκε λάθος δείγμα	Επαναλαμβάνετε με το σωστό δείγμα ελέγχου
Σφαιρίδιο Θετικού Ελέγχου (PC) Αποτυχία ορίου με Δείγμα Ασθενούς	Διακυβευμένο συζευκτικό, π.χ., φωτολεύκανση	Χρησιμοποιήστε καινούργιο κιτ
	Ανεπαρκής έκπλυση	Επαναλάβετε και παρακολουθήστε τις εκπλύσεις
Μη ομαλό μοτίβο ορού Θετικού μάρτυρα	Λανθασμένη προσθήκη δείγματος	Επαναλάβετε με το σωστό δείγμα μάρτυρα
	Ανεπαρκής έκπλυση	Επαναλάβετε και παρακολουθήστε τις εκπλύσεις
Θετική ανάθεση για ορό αρνητικού ελέγχου (>2 HLA συζευγμένα σφαιρίδια) ή >1000 MFI.	Προστέθηκε λάθος δείγμα	Επαναλαμβάνετε με το σωστό δείγμα ελέγχου
	Ανεπαρκής έκπλυση	Επαναλάβετε και παρακολουθήστε τις εκπλύσεις για να βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια έχουν εναιωρηθεί ξανά κατά την έκπλυση Μειώστε την ισχύ κενού
	Μόλυνση του μίγματος σφαιριδίων, Ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, Αρνητικού Ελέγχου Ορού ή Συζευγμένο Συμπύκνωμα με θετικό δείγμα	Χρησιμοποιήστε καινούργιο κιτ
Βουλωμένη πλάκα φίλτρου	Αιωρούμενα σωματίδια στο δείγμα	Κάνετε φυγοκέντρηση στο δείγμα για περίπου 5 λεπτά στους 8,000 – 12,000xg

## ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Όταν τα κιτ LIFECODES LSA χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται, τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν την παρουσία ή απουσία HLA αντισωμάτων IgG. Κλινικές δοκιμές χρησιμοποιώντας τις προκαθορισμένες τιμές διακοπής LABScreen, με βαθμολογία >4 να θεωρείται θετική.

### LSA Τάξης I

Το κιτ LIFECODES LSA Τάξης I έδειξε 93,7% (93,4%) συμφωνία για 151 δείγματα με ταιριασμένα αντιγόνα όταν συγκρίθηκε με αποτελέσματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το LABScreen Μονού Αντιγόνου HLA Τάξης I- Combi, Αρ. Κατ. LS1A04 (μονόπλευρο 95% όριο χαμηλότερης εμπιστοσύνης).

### LSA Τάξης II

Το κιτ LIFECODES LSA Τάξης II έδειξε 90,5% (89,9%) συμφωνία για 150 δείγματα με ταιριασμένα αντιγόνα όταν συγκρίθηκε με αποτελέσματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το LABScreen Μονού Αντιγόνου HLA Τάξης II- Group 1, Αρ. Κατ. LS2A01 (μονόπλευρο 95% όριο χαμηλότερης εμπιστοσύνης).

## IgG.IΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

## **ΕΞΟΥΣΙΟΔΟΤΗΜΕΝΟΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟΣ**

**Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος:** Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32 D-63303, Dreieich, Γερμανία  
Τηλέφωνο: +49 (0)6103 80560), Φαξ: +49 (0) 6103 8056199

**Τεχνικό σέρβις στην Ευρώπη:** +32/3 385 47 91



**Εκδόθηκε:** 2017-03-27