

Documentación del producto y traducciones disponibles en: www.immucor.com

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

LIFECODES Clase I LSA™: es un ensayo cribado de Luminex® para detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA de clase I.

LIFECODES Clase II LSA™: es un ensayo cribado de Luminex® para detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA de clase II.

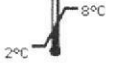
Para diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos	1	Procedimiento	3
Uso	2	A. Materiales suministrados.	3
Resumen y explicación	2	B. Materiales necesarios, pero no	
Principios del procedimiento	2	suministrados.....	3
Reactivos	2	Instrucciones de uso	4
A. Identificación.....	2	Resultados	5
B. Advertencias y precauciones.....	3	Control de calidad	5
C. Instrucciones de conservación.....	3	Limitaciones del procedimiento	5
D. Purificación o tratamiento para su uso.....	3	Resolución de problemas	6
E. Indicaciones de inestabilidad.....	3	Características específicas de	
Equipos necesarios	3	rendimiento	6
Recogida y preparación		Referencias	6
de las muestras	3		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas del producto y documentación suplementaria)

Código de lote	LOT	Número de referencia	REF	Fecha de caducidad		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Muestra	SAMPLE	Fabricante		Umbral de MFI	MFI TH	Temperatura (almacenamiento)	
Diluentes de titular	DIL	Fotosensible (Proteger de la luz)		Suficiente para N pruebas		Consulte las instrucciones de uso	
Nombre del paciente	NAME	Número de identificación	ID#	Fecha	DATE	Técnico	TECH
Microesfera	BEAD	Clase I	CLI	Clase II	CLII	Valor de corte	CUT-OFF
Fondo	BKG	Antígeno	AG	La mediana de la intensidad de la fluorescencia	MFI	Interpretación	INTRP
Microesfera de control negativo	NC	Microesfera de control positivo (Inmunoglobulina G)	PC	Fecha de extracción de la muestra	BDT	Identificación del antígeno	ANTIGEN ID
Antígeno de más baja clasificación	LRA	MFI / Antígeno de más baja clasificación	MFI/LRA	Advertencia		Límites observados	OBSERVED LIMITS
Densidad de antígeno relativa	RAD	Equivalente serológico	SERO				

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF 2023/24588443-APN-INPM#ANMAT

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los antígenos leucocíticos humanos (HLA) constituyen un sistema de glicoproteínas que desempeña un papel funcional en la presentación de péptidos al sistema inmunitario.^{1,2} Sin embargo, por tratarse de un sistema muy polimórfico, las moléculas HLA pueden convertirse en el blanco de respuestas humorales (de anticuerpos) durante el embarazo, la transfusión de hemoderivados o el rechazo a trasplantes de órganos. Por lo general, la aloinmunización conduce a la producción de anticuerpos anti-HLA aproximadamente en el 33% de los individuos expuestos.³ La presencia o ausencia de estos anticuerpos específicos anti-HLA es uno de los factores que determinan la supervivencia de los alotrasplantes.⁴

Las microesferas LIFECODES Clase I LSA™ se han ideado para detectar anticuerpos IgG frente a las glicoproteínas de HLA de clase I. LIFECODES Clase I LSA™ se compone de microesferas Luminex específicas conjugadas a glicoproteínas de HLA de clase I purificadas por afinidad.

Las microesferas LIFECODES Clase II LSA™ se han ideado para detectar anticuerpos IgG frente a las glicoproteínas de HLA de clase II. LIFECODES Clase II LSA™ se compone de microesferas Luminex específicas conjugadas a glicoproteínas de HLA de clase II purificadas por afinidad.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Se deja incubar una alícuota de las microesferas con un pequeño volumen de la muestra de suero problema. Seguidamente, se lavan las microesferas sensibilizadas para eliminar los anticuerpos que no se hayan fijado. Se añade luego un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Tras otra incubación, se diluye la muestra problema y se analiza en el aparato Luminex. Se compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la de la microesfera específica del locus de más baja calificación incluida en la preparación, para determinar si aquella es positiva o negativa en cuanto al aloanticuerpo unido.

REACTIVOS

A. Identificación

265100: LSA1 LIFECODES Clase I LSA™ consiste en cinco (5) componentes en cantidad suficiente para llevar a cabo 24 ensayos.

- 265103 LSA1B Mezcla de microesferas LSA de clase I (960 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase I más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. **Consérvelo por debajo de ≤ 65°C en la oscuridad.**
- 265002 LSACJ Conjugado concentrado LSA (120µL):** Reserva de anticuerpos caprinos anti-IgG humana conjugados con ficoeritrina en un tampón fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20 y azida sódica. **DIL DEBE DILUIRSE 1:10 en tampón de lavado antes de su uso. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante períodos de tiempo prolongado. Consérvelo a 2-8°C en la oscuridad.**
- 628221 LMWB Tampón de lavado LIFECODES (30 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y albúmina de suero bovino. **Consérvelo a entre 2 y 8°C y equilibrelo a temperatura ambiente antes de su uso (20-24°C).**
- 265101 LSAPC1 Control positivo LSA de clase I (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**
- 265102 LSANC1 Control negativo LSA de clase I (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**

265200: LSA2 LIFECODES Clase II LSA™ consiste en cinco (5) componentes en suficiente cantidad para 24 ensayos.

- 265203 LSA2B Mezcla de microesferas LSA de clase II (960 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase II más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. **Consérvelo por debajo de ≤ 65°C en la oscuridad.**
- 265010 LSACJ Conjugado concentrado LSA (120µL):** Reserva de anticuerpos caprinos anti-IgG humana conjugados con ficoeritrina en un tampón de fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20 y azida sódica. **DIL DEBE DILUIRSE 1:10 en tampón de lavado antes de su uso. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante períodos de tiempo prolongado. Consérvelo a 2-8 °C en la oscuridad.**
- 628221 LMWB Tampón de lavado LIFECODES (30 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y albúmina de suero bovino. **Consérvelo a entre 2 y 8°C y equilibrelo a temperatura ambiente antes de su uso (20-24°C).**
- 265201 LSAPC2 Control positivo LSA de clase II (100 µL):** Esta mezcla de suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase II. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**
- 265202 LSANC2 Control negativo LSA de clase II (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase II. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

B. Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico in vitro.
2. En los análisis realizados con métodos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration*) (FDA, por sus siglas en inglés), el material de origen humano utilizado en la producción de este kit ha resultado negativo para el VIH, el HCV y el HbsAg (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B). Aun así, ninguna prueba puede garantizar plenamente la ausencia de agentes infecciosos. Por lo tanto, cuando trabaje con estos materiales, **observe las precauciones universales**.
3. La sustitución de los componentes por otros distintos de los incluidos en este sistema puede conducir a resultados erróneos.
4. Los reactivos contienen como conservantes azida sódica al 0,1% que puede reaccionar con las conducciones de plomo y cobre, y formar azidas metálicas explosivas. Cuando elimine los materiales por el desagüe, utilice grandes cantidades de agua.
5. La contaminación bacteriana de las muestras o la presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas puede incrementar las uniones inespecíficas y dar resultados erróneos.
6. Este producto detecta anticuerpos IgG que pueden ser o no linfocitotóxicos.
7. No se prevé que el producto detecte anticuerpos de las inmunoglobulinas de las clases IgA o IgM.
8. Las decisiones clínicas que afectan el tratamiento de un paciente no se basan únicamente en la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos frente a HLA. Antes de un trasplante, se realiza sistemáticamente una prueba de histocompatibilidad cruzada.
9. Estos productos se han ideado para utilizarse con el aparato Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante.
10. Elimine todo el material después de su uso de conformidad con las normas locales.
11. Para más información, consulte las ficha(s) de datos de seguridad (MSDS).

C. Instrucciones de conservación

1. Consulte en las etiquetas del producto las indicaciones de conservación.
2. Las microesferas y el conjugado concentrado son **SENSIBLES A LA LUZ**. No exponga estos productos a la luz durante más de 3 horas.

D. Purificación o tratamiento necesario para su uso

1. Vea "Recogida y preparación de las muestras".
2. El conjugado concentrado debe diluirse 1:10, en un tampón de lavado, antes de su uso.

E. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbios o hayan sobrepasado la fecha de caducidad.
2. Elimine todos los controles positivos y negativos diluidos que no haya utilizado, así como el conjugado después de su uso.

EQUIPOS NECESARIOS

Aparato Luminex y plataforma XY (Lifecodes, número de referencia 888300, 888302)

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La muestra de sangre debe recogerse sin anticoagulantes y con una técnica aséptica, y analizarse mientras esté fresca, para minimizar las posibilidades de obtener reacciones positivas o negativas falsas debido a un almacenamiento incorrecto o a la contaminación de la muestra. Se debe guardar el suero a una temperatura de entre los 2°C y los 8°C, durante un periodo máximo de 48 horas. Si el suero va a estar almacenado durante más de 48 horas, debe congelarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C, por un periodo máximo de 2 años. Laboratorios individuales deben establecer y validar los métodos para almacenar sera durante más de dos años. Antes de almacenar o transportar el suero, es preciso separarlo de los eritrocitos. No congele y descongele repetidamente las muestras de suero.

No utilice sueros con contaminación microbiana, hemolizados, lipémicos o inactivados por calor, ya que pueden dar resultados incongruentes.

Antes del ensayo, todas las muestras deben agitarse en Vórtex y centrifugarse (30 segundos a 10.000 xg) para sedimentar la materia particulada existente.

PROCEDIMIENTO

A. Materiales suministrados (Véase REACTIVOS en la página 2 para obtener información más específica)

- Microesferas LSA
- Conjugado concentrado
- Tampón de lavado
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Hoja de registro
- Hoja de formato de placa

B. Materiales, reactivos y equipos necesarios, pero no suministrados (los de la lista o equivalentes)

- Pipetas ajustables de 5 µL – 50 µL con las puntas adecuadas
- Pipeta multicanal de 250 µL con las puntas correspondientes y cubeta para tampón
- Tubos de microcentrifugación de 1,5 mL para diluciones conjugadas
- Tubos de ensayo para las muestras del paciente y los controles
- Cronómetro
- Rotulador
- Placas de filtro MultiScreen de Millipore (Cat. n° MSBVN1210, MSBVN1250; Lifecodes Cat. n° 888633 o 888315-50)
- Sistema de vacío Multiscreen (Millipore Cat # MAVM 0960R, Qiagen Cat # 19504, Lifecodes Cat. n° 888315)
- Fluido del citómetro Luminex (Lifecodes Cat. n° 628005)
- Kits de calibración Luminex (Kit de calibración Luminex 100/200, Kit de verificación de rendimiento Luminex 100/200, Lifecodes Cat. n° 628018 y 628019, respectivamente)
- Agua destilada
- Plataforma rotatoria
- Cubiertas de microplacas 96 pozos (Cat. n° 165211, 165212)

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se DEBE proceder con cuidado para no contaminar el tampón de lavado ni el reactivo del conjugado concentrado (anti-IgG humana). La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano neutralizará los anticuerpos anti-IgG humana y, consecuentemente, el análisis resultará erróneo.
- Se debe proceder con cuidado para controlar la intensidad del vacío. Una fuerte presión de vacío puede causar que las microesferas se unan a las membranas y el recuento de las microesferas sea erróneo.
- Se debe proceder con cuidado cuando se vierta mediante la pipeta dentro de la placa del filtro para que las microesferas no se adhieran a los pocillos de las microplacas. Las microesferas deben pipetearse cuidadosamente dentro del pocillo para que la punta de la pipeta no roce la membrana. Si la punta entra en contacto con la membrana, puede perforarla y el análisis resultará erróneo.
- Se deben tomar precauciones para que en las fases de incubación las microesferas no salpiquen y se adhieran a las paredes de los pocillos. Al realizar el análisis por primera vez, analice algunos controles positivos, negativos o de ambos tipos para determinar la velocidad óptima de la plataforma rotatoria o el agitador vórtex. Se ha comprobado que una velocidad de aproximadamente 200 rotaciones por minuto con un tamaño de órbita de 19mm es eficaz en algunos aparatos.
- La presencia de niveles significativos de anticuerpo no ligado una vez terminado el lavado, debido a un exceso de suero o a un lavado insuficiente, puede reducir la capacidad del análisis para detectar la IgG unida a las microesferas sensibilizadas y dar lugar a resultados erróneos.
- En cada análisis deben incluirse sueros control positivo y negativo que permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos
- El ensayo se valida con 10µL de suero (Protocolo 1) y 20µL de suero (Protocolo 2).

1. Retire la mezcla de microesferas LSA del congelador y almacénala en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que se descongele. Luego, colóquela sobre hielo y protéjala de la luz. **NOTA: La mezcla de microesferas puede congelarse y descongelarse hasta por 6 veces sin que afecte su rendimiento, según se indica en el Uso Previsto.**
2. Mientras mantiene los demás componentes a 2-8°C en la oscuridad hasta que los necesite, deje que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) antes de usarlo. Durante este tiempo utilice la hoja de formato de placa para asignar una posición en la placa a cada uno de los sueros y controles que va a analizar. Los sueros control suministrados con el kit se utilizan para mostrar un alosuero positivo con amplia reactividad y un suero negativo.
3. Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtro con una cubierta de plástico adhesivo. Humedezca previamente los pocillos que va a utilizar con 100-300 µL de agua destilada. Entre 2 y 5 minutos después, retire el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío. (Para utilizarlo correctamente, consulte las recomendaciones del fabricante.)
4. Prepare brevemente (30 segundos) las microesferas LSA centrifugando el vial a 600 – 800 xg para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agite bien en vórtex (-1 minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.
5. Añada 40 µL de microesferas LSA a cada uno de los pocillos asignados. Mientras distribuye las microesferas, agite en vórtex cada 2 minutos el vial de las microesferas LSA para mantenerlas en suspensión, y luego añada 10 µL del suero del paciente y del suero de control (Protocolo 1) o 20 µL del suero del paciente y del suero de control (Protocolo 2) y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas resuspendidas para asegurar que se distribuyan suficientes microesferas en los pocillos y tiempos reducidos de recuento. Si las microesferas no se agitan intermitentemente en vórtex, se depositarán en el fondo del tubo. Esto causará que se dispense una cantidad diferencial de microesferas en los pocillos, lo cual puede afectar negativamente a los tiempos de ensayo y el análisis de los resultados.

6. Cubra la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protéjala de la luz con papel de aluminio o en una caja. Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, los sueros control y las microesferas que no haya utilizado, para usos futuros. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a ≤ -65°C, las porciones que no haya utilizado de la mezcla de microesferas LSA, para usos futuros.
7. Diluya el conjugado con tampón de lavado (5 µL de conjugado en 45 µL de tampón de lavado por muestra). Para compensar las pérdidas por pipeteo, es aconsejable preparar un (1) volumen extra de conjugado diluido. Cúbralo con papel de aluminio o consérvelo en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que lo utilice. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, el conjugado concentrado que no haya utilizado, para usos futuros.
8. Tras los 30 minutos de incubación, retire la cubierta de plástico adhesivo y añada 100 µL de tampón de lavado a cada pocillo. Mezclar para volver a suspender las perlas y succionar ligeramente la placa.

PRECAUCIÓN: Si la intensidad de vacío es excesiva, las microesferas se adherirán a la membrana y puede causar que el análisis de la muestra fracase. Aplique la presión de vacío mínima necesaria para aspirar las muestras.

9. Añadir 250 µL de Buffer de lavado a cada pozo, mezclar para volver a suspender las perlas, succionar y repetir dos veces más el procedimiento para realizar un total de tres lavados.

PRECAUCIÓN: Un lavado incompleto puede reducir la capacidad del conjugado de detectar IgG unida a microesferas sensibilizadas y conducir falsos negativos.

10. Añada 50 µL de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Proteja la placa de la luz con papel de aluminio o en una caja. Colóquela en una plataforma rotatoria (a 200 rotaciones por minuto) o agítela suavemente en vórtex cada 5-10 minutos. Incúbela durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C).
11. Con una punta de pipeta limpia, añada de 130 a 150 µL de tampón de lavado en cada pocillo y mezcle para resuspender las microesferas.
12. Recolecte los datos con el aparato Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un retraso de más de 3 horas puede aumentar las probabilidades de obtener reacciones falsamente positivas o falsamente negativas. Vuelva a almacenar a 2-8°C el tampón de lavado que no haya utilizado, para usos futuros.

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT



RESULTADOS

Introduzca los valores de Intensidad Mediana de Fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) cruda para cada microesfera en la hoja de registro específica del lote. Para determinar si una microesfera es positiva, primero determine si el valor de MFI de cada microesfera con antígeno unido es superior al umbral indicado en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit. Si el valor de MFI de una determinada microesfera con antígeno unido es superior al umbral, divida su MFI por el del antígeno de más baja clasificación (LRA, por sus siglas en inglés) del locus correspondiente, para obtener el cociente MFI/Antígeno de más baja clasificación (MFI/LRA). El LRA de cada locus es el valor de MFI de la microesfera con antígeno de más baja clasificación para ese locus.

Ejemplo : $\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "1"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "x" del locus "1"}$

$\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "2"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "y" del locus "2"}$

$\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "3"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "z" del locus "3"}$

Consulte en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit, la lista de antígenos presentes en cada microesfera, y el valor de corte para determinar el resultado positivo/negativo para cada microesfera con antígeno unido. Se considera que una microesfera con antígeno unido es positiva cuando el valor de MFI es superior al umbral de MFI y el cociente MFI/LRA es superior al valor de corte.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de LSA de clase I y clase II se desarrolla dentro del sistema de pruebas, incluyendo un suero control positivo y negativo. Estos sueros control deben incluirse con cada prueba que se realice para ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos de reactivos. Los sueros del control positivo reaccionarán con un número elevado de microesferas conjugadas con HLA dando lugar a un patrón similar al indicado en la hoja de registro específica del lote. Los sueros de control negativo reaccionarán con pocas o ninguna de las microesferas conjugadas con HLA dando lugar a valores de MFI cruda ≤ 1000 .

Los juegos de microesferas incluyen microesferas de control para verificar los resultados de cada muestra. La microesfera de control positivo está recubierta con IgG humana y debería indicar una MFI ≥ 10.000 con los sueros control. Si se obtienen valores de MFI inferiores a 10.000 con los sueros control, es probable que el lavado del ensayo haya sido insuficiente o que el conjugado no esté en buenas condiciones. Las muestras de pacientes muestran un amplio rango de reactividad con la microesfera de control positivo, pero siempre deberían generar una señal de MFI ≥ 10.000 . La microesfera de control negativo debería generar valores bajos de MFI con los sueros de control. Consulte en la hoja de registro específica del lote los límites observados para las microesferas de control con los sueros de control.

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del envase, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplen las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana de los materiales, incubaciones demasiado cortas, lavado o decantado insuficiente de las microesferas, exposición del conjugado a luz parásita u omisión de reactivos o etapas de la prueba.

La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobina en la muestra del paciente puede incrementar las uniones inespecíficas y producir resultados erróneos en este ensayo.

Los anticuerpos detectados por los kits LSA son aquellos reactivos dentro de la población de antígenos disponibles detallados en la hoja de registro.

Las glicoproteínas de un solo antígeno HLA, de clase I y II, de LIFECODES se obtuvieron de líneas de células que indicaban antígenos individuales HLA.

Algunos IgG con baja avidéz o título bajo, IgA, IgM y anticuerpos monoespecíficos contra antígenos no incluidos en el panel, no se detectarán con ensayos de un solo antígeno de LIFECODES.

Los títulos de anticuerpos del suero están específicamente relacionados al paciente y a momentos determinados. Si muchas microesferas están produciendo valores de MFI mayores de 15.000, puede ser necesario diluir los sueros para detectar mejor los anticuerpos IgG.

Debido a la complejidad del análisis de HLA, la interpretación de los datos debería ser revisada por personal cualificado. En la determinación de la especificidad de los anticuerpos con los kits LSA deben tenerse en cuenta los resultados de todas las microesferas, incluyendo aquellas iguales o similares al valor de corte. Puede ser útil el conocimiento del paciente y la comprensión de los grupos con reactividad cruzada para asignar la especificidad a un suero determinado.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Escaso número de microesferas	La mezcla de microesferas no está correctamente suspendida	Agítela en vórtex por pulsos para resuspenderla por completo
	Fallo del aparato – Mal equilibrado	Consulte el manual del aparato
	Fallo del aparato – Bloqueo del flujo de muestra	Consulte el manual del aparato
	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un nuevo kit
	Presión de vacío demasiado elevada/microesferas adheridas a la membrana	Reduzca la intensidad del vacío; para las placas de filtro MultiScreen de Millipore se recomienda un vacío de 271- 406 mb (203-305 mm Hg)
Se sobrepasa el umbral para la microesfera de control negativo (NC) con los sueros de control	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
No se alcanza el umbral para la microesfera de control positivo (PC) con los sueros de control	Conjugado en mal estado (p.ej., fotoblanqueo)	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
No se alcanza el umbral para la microesfera de control positivo (PC) con la muestra del paciente	Conjugado en mal estado (p.ej., fotoblanqueo)	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
Resultado anómalo para el suero control positivo	Muestra agregada incorrecta	Repita con la muestra control correcta
	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
Asignación positiva para los sueros de control negativo (> 2 microesferas conjugadas con HLA) o MFI >10.000	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados para asegurar que las microesferas se resuspenden correctamente
		Reduzca la intensidad del vacío
	Contaminación de la mezcla de microesferas, el tampón de lavado, los sueros de control negativo o el conjugado concentrado con muestra positiva	Utilice un nuevo kit
Placa de filtro obstruida	Materia particulada en la muestra	Centrifugue la muestra durante aproximadamente 5 minutos a 8.000 – 12.000 xg

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuando se utiliza el kit LIFECODES LSA siguiendo el procedimiento descrito, el resultado revela la presencia o la ausencia de anticuerpos IgG HLA. Para el ensayo clínico se usaron los valores de corte estándar de LABScreen, de modo que se consideraron positivas las puntuaciones > 4.

LSA Clase I

El kit LIFECODES LSA Clase I mostró una copositividad del 93,7 % (93,4 %) para 151 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class I- Combi, Cat. n° LS1A04 (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

LSA Clase II

El kit LIFECODES LSA Clase II mostró una copositividad del 90,5 % (89,9 %) para 150 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class II- Group 1, Cat. n° LS2A01(límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

REFERENCIAS

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.

REPRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32 D-63303 Dreieich, Alemania
Teléfono: +49 (0) 6103 80560, Fax: +49 (0) 6103 8056199

Servicio técnico para Europa: +32/3 385 47 91

Publicación: 2017-03-27



IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

La documentación del producto y las traducciones están disponibles en: WWW.IMMUCOR.COM

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

Detección del C3d de LIFECODES®

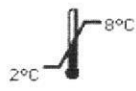
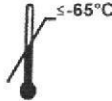
Para utilizarse en diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos.....	1	Recogida y preparación de muestras.....	3
Uso previsto.....	1	Instrucciones de uso.....	3
Resumen y explicación.....	1	Resultados.....	4
Principios del procedimiento.....	1	Control de calidad.....	4
Reactivos suministrados.....	2	Limitaciones del procedimiento.....	5
A. Identificación y condiciones de almacenamiento.....	2	Resolución de problemas.....	5
B. Advertencias o precauciones.....	2	Características específicas del rendimiento.....	5
C. Purificación o tratamiento para el uso..	2	Referencias	6
D. Indicaciones de inestabilidad.....	2	Fabricante y representante autorizado....	6
Materiales necesarios pero no suministrados.....	2		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas de los productos y documentos complementarios)

Código del lote		Número de catálogo		Fecha límite de uso		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Fabricante		Sensible a la luz (Mantenga alejado de la luz)		Temperatura (almacenamiento)		Cantidad suficiente para N pruebas	
Representante autorizado en la Comunidad Europea		Advertencia					

USO PREVISTO

El kit de detección del C3d LIFECODES® es un equipo de análisis cualitativo para detectar el complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos del suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Este producto se ha diseñado para detectar el complemento C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos. Este producto contiene el anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE, microesferas de control positivo y un complemento con sueros humanos y un tampón de lavado.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Una parte alícuota de los antígenos HLA vinculados a las microesferas se deja incubar con un pequeño volumen de muestra de suero de prueba. Después de esta incubación inicial, se agrega un reactivo de suero negativo como fuente de complemento para una incubación adicional. Las microesferas sensibilizadas se lavan posteriormente para quitar el anticuerpo no vinculado. Se agrega después un anticuerpo contra el C3d humano conjugado con ficoeritrina. Después de otra incubación, se lava la muestra de prueba, se diluye y se

analiza con el instrumento Luminex. La intensidad de la señal de cada microesfera de la muestra de prueba se compara con la intensidad de la señal de los sueros de control negativo con el fin de determinar si la muestra se considera positiva o negativa para el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

A. Identificación y condiciones de almacenamiento

Número del producto de detección del C3d: 265400

1. **C3dCJ** Conjugado del C3d (número de pieza: 265410; 1200 µL). Anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE en un tapón de almacenamiento de base fosfatada, listo para utilizarse, que contiene NaCl, Tween-20 y azida de sodio. SENSIBLE A LA LUZ. Mantenga alejado de la luz directa durante periodos prolongados. **Almacene a 2 - 8 °C en la oscuridad hasta 3 meses o a ≤-65 °C hasta la fecha de caducidad.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces a ≤-65 °C después de la descongelación inicial.
2. **C3dCS** Suero de complemento (número de pieza: 265415; 2 frascos de 360 µL). Suero de donante varón al que no se ha realizado transfusión. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 4 veces después de la descongelación inicial.
3. **C3dPCB** Microesfera de control positivo del C3d (número de pieza: 265405; 24 µL). El tapón de almacenamiento es de base fosfatada y contiene NaCl, Tween-20, azida de sodio y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces después de la descongelación inicial.
4. **LMWB** Tapón de lavado (número de pieza: 628221; 30 mL). Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. **Consérvelo a 2-8 °C** y equilibrelo con la temperatura ambiente (20 a 24 °C) antes de usarlo.

B. Advertencias o precauciones

1. Para utilizarse en diagnóstico *in vitro*
2. El material de origen humano usado para producir este kit se ha sometido a pruebas y los resultados son negativos para anticuerpos del VIH, VHC y HBsAg según los métodos aprobados por la Dirección de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer la certeza absoluta de que no hay agentes infecciosos. Por tanto, **siga las «precauciones universales»** cuando trabaje con estos materiales.
3. Los reactivos contienen un 0,1 % de azida de sodio como agente conservante, que puede reaccionar con los elementos de fontanería de plomo y cobre para formar azidas metálicas explosivas. Utilice grandes cantidades de agua cuando deseché materiales por un fregadero.
4. La contaminación bacteriana de las muestras o la existencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina pueden causar un aumento de los vínculos no específicos y generar resultados erróneos.
5. Después de utilizarlos, deseché todos los materiales según las normativas locales.
6. Consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales para obtener información adicional.
7. En los sueros de complemento almacenados a 2 - 8 °C durante periodos largos se ha observado que la actividad del complemento se reduce.
8. Las microesferas y el conjugado son SENSIBLES A LA LUZ. La exposición a la luz que exijan las actividades rutinarias se limitará a un máximo de tres horas.

C. Purificación o tratamiento necesario para el uso

1. Véase "Recogida y preparación de muestras".
2. Todos los componentes están listos para su uso y no se requiere ninguna dilución.

D. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbidos o cuya fecha de caducidad haya vencido.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS necesarios pero NO SUMINISTRADOS

- Kits LIFECODES LSA clase I (número de pieza: 265100, LSA1) o LIFECODES LSA clase II (número de pieza: 265200, LSA2).
- Equipo necesario para realizar los análisis LIFECODES LSA clase I o clase II de (véase el folleto informativo correspondiente LC1683CEES).



RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DEL SUERO

Se debe recoger sangre sin anticoagulante, utilizando una técnica aséptica, y se debe someter a las pruebas mientras esté reciente o se debe almacenar apropiadamente con el fin de reducir al máximo la posibilidad de reacciones de falsos positivos o de falsos negativos debidas a un almacenamiento inadecuado o a la contaminación de la muestra. El suero debe almacenarse a 2 - 8 °C hasta un máximo de 48 horas. Si el suero ha de almacenarse durante más de 48 horas, debe congelarse a -20 °C o menos, o a -80 °C si se ha de conservar hasta 2 años. Los laboratorios individuales deben establecer y validar métodos para almacenar sueros durante más de 2 años. El suero debe separarse de los glóbulos rojos cuando se almacena o transporta. Evite congelar y descongelar de manera repetida las muestras de suero.

PRECAUCIÓN: No utilice sueros contaminados microbiológicamente, hemolizados o lipémicos, ya que estos pueden producir resultados incoherentes.

Antes de los análisis, se deben agitar brevemente en vórtice y centrifugar todas las muestras (30 segundos a $\approx 10\,000g$) para sedimentar cualquier material particulado que pueda estar presente.

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se DEBE tener cuidado para evitar la contaminación del tapón de lavado y del reactivo contra el C3d humano. La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano puede producir posteriormente un error en la prueba.
- Una muestra de sueros de control positivo y negativo se debe incluir con cada prueba con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo.
- El suero de complemento es un reactivo de suero negativo necesario para el análisis de detección del C3d como fuente estándar de complemento.
- Además, siga las precauciones generales descritas en el folleto informativo del producto LIFECODES LSA (LC1683CEES).

- Encienda el instrumento Luminex con el fin de permitir un calentamiento de 30 minutos.
- Retire la mezcla de microesferas LSA, la microesfera de control positivo del C3d (C3dPCB), el suero de complemento del C3d (C3dCS) y el conjugado del C3d (C3dCJ) del congelador de -65 °C y almacene en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se descongelen. Después de descongelar, coloque inmediatamente en hielo y proteja de la luz.
- Permita que el tapón de lavado alcance la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de utilizarse. En este período, utilice la hoja de formato de la placa (LC979) para asignar una posición en placa para cada suero y para los controles que se analizarán. **Los sueros de control negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2) se usan como control negativo.**
- Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtros con una cubierta plástica adhesiva. Humedezca previamente los pocillos que se utilizarán con 100-300 μL de agua destilada. Después de 2-5 minutos, quite el agua mediante una aspiración delicada utilizando un colector de vacío. (Véanse las recomendaciones del fabricante para conocer el uso adecuado.)
- Prepare las microesferas LSA centrifugando el frasco brevemente (30 segundos) a $\approx 600 - 800 \times g$ con el fin de retirar cualquier microesfera o líquido de la tapa o paredes del frasco. Agite en vórtice por completo (≈ 1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme. En otro frasco combine 1 μL /muestra de C3dPCB con el volumen apropiado de microesferas LSA (40 μL /muestra). Agite en vórtice por completo (≈ 1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme.
- Agregue 40 μL de la mezcla de microesferas LSA con C3dPCB a cada pocillo asignado. Agite en vórtice el frasco de microesferas LSA cada 2 minutos para mantener las microesferas en suspensión a la vez que estas se distribuyen. Centrifugue el suero (30 segundos a $\approx 10,000 \times g$) y agregue 10 μL de suero o suero de control y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas nuevamente suspendidas para garantizar que se distribuyen suficientes microesferas en los pocillos y lograr unos períodos reducidos de recuento de microesferas. Si no se agitan en vórtice las microesferas de manera intermitente, esto hará que las microesferas se asienten en la parte inferior del tubo. De esta manera, se dispensarían las microesferas en cantidades diferenciales en pocillos, lo que podría afectar de manera adversa a los tiempos de ejecución y al análisis de los resultados.

- Cubra la placa con una cubierta plástica adhesiva y a continuación coloque láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) en la oscuridad en una plataforma giratoria (200 rotaciones por minuto). Vuelva a colocar las partes no usadas de los sueros de control en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro. Vuelva a colocar las partes no usadas de la mezcla de microesferas LSA y C3dPCB en el lugar de almacenamiento a una temperatura de ≤ -65 °C en la oscuridad para uso futuro.
- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 30 μL de C3dCS a cada pocillo incluyendo el de control negativo. Vuelva a colocar el C3dCS en el lugar de almacenamiento a ≤ -65 °C inmediatamente después del uso. Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IR-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT
PAULA
Directora
12.00



plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5-10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 – 24 °C).

- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.

PRECAUCIÓN: Si se usa una fuerza de aspiración excesiva, esto hará que las microesferas se adhieran a la membrana y producirá un fallo de la muestra. Aplique la presión mínima de vacío necesaria para aspirar las muestras.

- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo, aspire y repita tres veces más.

PRECAUCIÓN: Si no se lava por completo, se puede reducir la capacidad del conjugado de detectar el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos y los resultados producidos pueden ser falsos negativos.

- Centrifugue el C3dCJ durante 30 segundos en una microcentrifugadora (≈600 – 800 x g). El C3dCJ está listo para su uso y no se necesita ninguna dilución. Agregue 50 µL de C3dCJ a cada pocillo. Almacene el C3dCJ restante a 4 °C durante un máximo de tres meses o almacénelo a ≤-65°C hasta la fecha de caducidad.
- Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5 - 10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 24°C).
- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.
- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo y aspire.
- Utilice una punta de pipeta limpia, agregue 200 µL de tapón de lavado en cada pocillo y mezcle para volver a suspender las microesferas.
- Recabe los datos con el instrumento Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante **y utilice una plantilla de C3d de Luminex (consulte la documentación de LIFECODES LSA para conocer información específica del lote)**. Los retrasos mayores a 3 horas a temperatura ambiente pueden aumentar la posibilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos. Vuelva a colocar las partes no usadas del tapón de lavado en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro.

RESULTADOS

Detección del C3d: Para analizar los resultados de un lote de muestras:

- Cree una hoja de cálculo en Excel abriendo una copia del archivo de resultados en formato CSV con los resultados del lote de Luminex y "Guarde como" archivo de Excel. Se utilizará este archivo para los cálculos necesarios para analizar los resultados.
- Copie, de la hoja de cálculo de registro específica para el lote incluida en el kit LSA, el nombre del antígeno que corresponde a cada microesfera.
- Después, reste los valores la MFI del suero de control negativo (MFI del suero de control negativo) de la MFI no procesada para cada microesfera individual con el fin de calcular la MFI ajustada al contexto.

(a) $MFI \text{ ajustada al contexto} = MFI \text{ de una muestra} - MFI \text{ del suero de control negativo}$

- A continuación, divida la MFI ajustada al contexto entre la MFI del control calculada (CalcCON) de su lugar respectivo para generar la proporción corregida para el contexto (BCR-Neg). El CalcCON de cada lugar es el valor de la MFI no procesada de la microesfera con el antígeno de menor categoría de ese lugar.

(b) $BCR\text{-}Neg = \frac{MFI \text{ ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El menor valor de MFI no procesada del lugar}}$

- Por último, divida la MFI ajustada al contexto del antígeno entre el valor correspondiente de la MFI del antígeno para el suero de control negativo LSA (NC) con el fin de generar la fuerza relativa (fuerza R).

(c) $Fuerza R = \frac{MFI \text{ ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El valor de la MFI no procesada del antígeno}}$

Se considera positiva una microesfera si dos o más de los valores ajustados están por encima de los valores límite. Consulte el certificado de análisis del producto de detección del C3d (265400) para conocer los límites predeterminados positivos y negativos. Al ajustar estos límites se pueden obtener sensibilidades mayores o menores.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de la detección del C3d está incorporado en el sistema de pruebas gracias a la inclusión de la microesfera de control positivo y del suero de control positivo y negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2). Estos controles deben incluirse en cada



análisis con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo. El suero de control positivo reaccionará con una serie de microesferas conjugadas LSA para generar un patrón similar al del gráfico de detección del C3d. El suero de control negativo reaccionará con solo unas pocas microesferas conjugadas LSA, e incluso podría no reaccionar.

La microesfera de control positivo del C3d debería generar valores de la MFI $\geq 10\,000$, con un análisis en que se utilice el suero de control negativo. Los valores de muestras menores que 10 000 pueden indicar que no se ha agregado suficiente cantidad de C3dCJ, que se ha lavado deficientemente el material de análisis o que la calidad de C3dCJ se ha visto afectada.

El recuento de microesferas debería ser de por lo menos 40 reacciones.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden darse resultados erróneos por la contaminación bacteriana de los materiales de pruebas, períodos inadecuados de incubación, el lavado inapropiado o la decantación de microesferas, la exposición de C3dCJ a luz dispersa o la omisión de reactivos o pasos en los análisis.

La presencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina en la muestra de sueros puede producir un aumento de vínculos no específicos y generar resultados erróneos de este análisis.

Los valores de los anticuerpos de los sueros son específicos de períodos y muestras. Si muchas microesferas producen valores de la MFI mayores que 15 000, podría ser necesario diluir los sueros.

Debido a la naturaleza compleja de las pruebas de los HLA y a los diversos factores que podrían afectar la cascada de complementos que conduce a la formación del C3d, los resultados se deben revisar e interpretar por parte de personas capacitadas. El uso de cualquier suero de control y de valores límite diferentes a aquellos suministrados en el certificado de análisis no ha sido validado.

Esta prueba no puede usarse como la única base para las decisiones clínicas.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

(Consulte también el folleto informativo de los productos LSA clase I y clase II de LIFECODES, LC1683CEES).

PROBLEMA	CAUSA POSIBLE	SOLUCIÓN
Bajo recuento de microesferas, solo para C3dPCB	No se agregaron suficientes microesferas a la mezcla de microesferas LSA	Vuelva a suspender completamente generando un vórtice breve, evite las pipetas de $<3\,\mu\text{L}$. Utilice pipetas calibradas.
	Fallos del instrumento - no se calibra correctamente	Vea el manual de Luminex
	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un frasco nuevo de C3dPCB
Valores de la MFI de control positivo del C3d con suero $<10\,000$	Se agregó C3dCJ fotoblanqueado o insuficiente a la reacción	Repita el análisis. Utilice un frasco nuevo de C3dCJ
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
Baja MFI para el suero de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	No se agregó suficiente C3dCJ a la reacción.	Repita el análisis con la cantidad correcta de C3dCJ.
	No se agregó suficiente C3dCS o no se agregó ningún C3dCS a la reacción.	Repita el análisis agregando C3dCS.
	Baja temperatura de análisis	Confirme que el análisis se realiza a 20°C - 24°C . Intente realizarlo en el límite superior de temperatura para lograr una MFI mayor.
Patrón anómalo para los sueros de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
MFI alta para los sueros de control negativo (>1500)	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados para garantizar que las microesferas se vuelven a suspender durante el lavado.
		Disminuya la potencia de aspiración.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

Cuando se utiliza el equipo de detección del C3d de LIFECODES según el procedimiento descrito anteriormente, los resultados revelan la presencia o ausencia del complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

Se realizó un estudio utilizando 142 muestras que comparaba la detección de C3d de LIFECODES y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC por sus siglas en inglés). Para este juego de muestras, la sensibilidad de la detección del C3d de LIFECODES era



mejor que la de la prueba de CDC para la detección del complemento de vínculo del anticuerpo HLA en muestras de suero positivo, según se desprende de los análisis LSA de las clases I y II de LIFECODES.

REFERENCIAS

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. y Clavien P.A. What's Hot, What's New at WTC—Clinical Science. *Am J Transplant*. 2015; 15(2): 327-332.
4. Lan, J. et al. Clinical Relevance of C3d-Binding Donor-Specific Antibodies in Late Kidney Allograft Failure. *Am J Transplant*. 2015; 15(S3).
5. Lan, J. et al. Complement-Fixing Donor-Specific HLA Antibodies Detected By Novel C3d Assay Are Associated With Antibody Mediated Rejection in Heart Transplant Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2015; 34(4): S130.
6. Toutirais, O. et al. Clinical outcome of heart transplant recipients with complement binding donor specific antibodies. *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 431.
7. Dubois, V. et al. Pregnancy and Donor-Specific HLA-antibody-mediated humoral rejection in young women after liver transplantation: "Liaisons Dangereuses"? *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 306.
8. Wahrmann, M. et al. Modified solid-phase alloantibody detection for improved crossmatch prediction. *Human Immunol*, 2013; 74(1): 32-40.
9. Sacks, S.H. and Zhou, W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nature Rev Immunol*, 2012; 12(6): 431-442.
10. Gieraj, 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.

REPRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Strasse 32, 63303 Dreieich, Germany

Servicio Técnico Europeo: +32/3 385 47 91

Emitido: 2017-02-23



HEMOMEDICA
PAULA
Directora
12.000

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT



(01)10888234400349



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES LSATM CLASS II

Box 1 of 2

LSA2

REF 265200

LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD

LSAPC2 265201

Box 1

LSANC2 265202

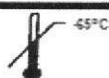
LMWB 628221

LSACJ 265010



LSA2B 265203

Box 2



EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



IVD



KEEP AWAY FROM LIGHT



265200LB Rev. A

ROTULO ORIGINAL

HEMOMEL
PAULA IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT
Diretor 12.03.2023

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



(01)10888234400332



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES LSA™ CLASS I

Box 1 of 2

LSA1

REF 265100

LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD

LSAPC1 265101

Box 1

LSANC1 265102

LMWB 628221

LSACJ 265002



LSA1B 265103

Box 2



EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



IVD



KEEP AWAY
FROM LIGHT



265100LB Rev. A

ROTULO ORIGINAL

HEMOMEDICA
PAULA
Diretor
12.05.2023

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



(01)10888234400486



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES C3d DETECTION Box 1 of 2

C3d

REF 265400

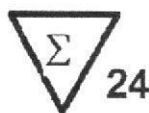
LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD

	C3dPCB	265405	Box 1: 265420-24
2X	C3dCS	265415	-65°C
	C3dCJ	265410	

Box 2: 628221 **LMWB** Shipped Separately

EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



265400LB Rev. A

KEEP AWAY FROM LIGHT

ROTULO ORIGINAL

HEMOMEL
PAULA
Directora
12.83.2023

IF-2023-24588443-APN INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



SOBREROTULO

HemoMedica

Importado por:

Hemomedica S.R.L.

California 2082, Piso 2, Of 217, CABA

Argentina

"Autorizado por ANMAT PM 1049-64"

DT: Ana Paula Zucchini. M.N. 12855

HEMOMEDICA
PAULA
Directora
M.N. 12.855

IR-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

Documentación del producto y traducciones disponibles en: www.immucor.com

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

LIFECODES Clase I LSA™: es un ensayo cribado de Luminex® para detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA de clase I.

LIFECODES Clase II LSA™: es un ensayo cribado de Luminex® para detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA de clase II.

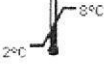
Para diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos.....	1	Procedimiento.....	3
Uso.....	2	A. Materiales suministrados.....	3
Resumen y explicación.....	2	B. Materiales necesarios, pero no suministrados.....	3
Principios del procedimiento.....	2	Instrucciones de uso.....	4
Reactivos.....	2	Resultados.....	5
A. Identificación.....	2	Control de calidad.....	5
B. Advertencias y precauciones.....	3	Limitaciones del procedimiento.....	5
C. Instrucciones de conservación.....	3	Resolución de problemas.....	6
D. Purificación o tratamiento para su uso.....	3	Características específicas de rendimiento.....	6
E. Indicaciones de inestabilidad.....	3	Referencias.....	6
Equipos necesarios.....	3		
Recogida y preparación de las muestras.....	3		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas del producto y documentación suplementaria)

Código de lote	LOT	Número de referencia	REF	Fecha de caducidad		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Muestra	SAMPLE	Fabricante		Umbral de MFI	MFI TH	Temperatura (almacenamiento)	
Diluyentes de car	DIL	Fotosensible (Proteger de la luz)		Suficiente para N pruebas		Consulte las instrucciones de uso	
Nombre del paciente	NAME	Número de identificación	ID#	Fecha	DATE	Técnico	TECH
Microesfera	BEAD	Clase I	CLI	Clase II	CLII	Valor de corte	CUT-OFF
Fondo	BKG	Antígeno	AG	La mediana de la intensidad de la fluorescencia	MFI	Interpretación	INTRP
Microesfera de control negativo	NC	Microesfera de control positivo (Immunoglobulina G)	PC	Fecha de extracción de la muestra	BDT	Identificación del antígeno	ANTIGEN ID
Antígeno de más baja clasificación	LRA	MFI / Antígeno de más baja clasificación	MFI/LRA	Advertencia		Límites observados	OBSERVED LIMITS
Densidad de antígeno relativa	RAD	Equivalente serológico	SERO				

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. ZEINOSO
Socio Gerente

IF-2023-24588443-APN-INRM#ANMAT

USO

LIFECODES Clase I y Clase II LSA™ son inmunoensayos basados en microesferas que se utilizan para detectar cualitativamente anticuerpos IgG frente a antígenos HLA.



RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los antígenos leucocíticos humanos (HLA) constituyen un sistema de glicoproteínas que desempeña un papel funcional en la presentación de péptidos al sistema inmunitario.^{1,2} Sin embargo, por tratarse de un sistema muy polimórfico, las moléculas HLA pueden convertirse en el blanco de respuestas humorales (de anticuerpos) durante el embarazo, la transfusión de hemoderivados o el rechazo a trasplantes de órganos. Por lo general, la aloinmunización conduce a la producción de anticuerpos anti-HLA aproximadamente en el 33% de los individuos expuestos.³ La presencia o ausencia de estos anticuerpos específicos anti-HLA es uno de los factores que determinan la supervivencia de los alotrasplantes.⁴

Las microesferas LIFECODES Clase I LSA™ se han ideado para detectar anticuerpos IgG frente a las glicoproteínas de HLA de clase I. LIFECODES Clase I LSA™ se compone de microesferas Luminex específicas conjugadas a glicoproteínas de HLA de clase I purificadas por afinidad.

Las microesferas LIFECODES Clase II LSA™ se han ideado para detectar anticuerpos IgG frente a las glicoproteínas de HLA de clase II. LIFECODES Clase II LSA™ se compone de microesferas Luminex específicas conjugadas a glicoproteínas de HLA de clase II purificadas por afinidad.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Se deja incubar una alícuota de las microesferas con un pequeño volumen de la muestra de suero problema. Seguidamente, se lavan las microesferas sensibilizadas para eliminar los anticuerpos que no se hayan fijado. Se añade luego un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Tras otra incubación, se diluye la muestra problema y se analiza en el aparato Luminex. Se compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la de la microesfera específica del locus de más baja calificación incluida en la preparación, para determinar si aquella es positiva o negativa en cuanto al aloanticuerpo unido.

REACTIVOS

A. Identificación

265100: **LSA1** LIFECODES Clase I LSA™ consiste en cinco (5) componentes en cantidad suficiente para llevar a cabo 24 ensayos.

1. **265103 LSA1B Mezcla de microesferas LSA de clase I (960 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase I más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. **Consérvelo por debajo de ≤ -65°C en la oscuridad.**
2. **265002 LSACJ Conjugado concentrado LSA (120µL):** Reserva de anticuerpos caprinos anti-IgG humana conjugados con ficoeritrina en un tampón fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20 y azida sódica. **DIL DEBE DILUIRSE 1:10 en tampón de lavado antes de su uso. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante períodos de tiempo prolongado. Consérvelo a 2-8°C en la oscuridad.**
3. **628221 LMWB Tampón de lavado LIFECODES (30 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y albúmina de suero bovino. **Consérvelo a entre 2 y 8°C y equilibre a temperatura ambiente antes de su uso (20-24°C).**
4. **265101 LSAPC1 Control positivo LSA de clase I (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**
5. **265102 LSANC1 Control negativo LSA de clase I (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**

265200: **LSA2** LIFECODES Clase II LSA™ consiste en cinco (5) componentes en suficiente cantidad para 24 ensayos.

1. **265203 LSA2B Mezcla de microesferas LSA de clase II (960 µL):** Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase II más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. **Consérvelo por debajo de ≤ -65°C en la oscuridad.**
2. **265010 LSACJ Conjugado concentrado LSA (120µL):** Reserva de anticuerpos caprinos anti-IgG humana conjugados con ficoeritrina en un tampón de fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20 y azida sódica. **DIL DEBE DILUIRSE 1:10 en tampón de lavado antes de su uso. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante períodos de tiempo prolongado. Consérvelo a 2-8 °C en la oscuridad.**
3. **628221 LMWB Tampón de lavado LIFECODES (30 mL):** Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y albúmina de suero bovino. **Consérvelo a entre 2 y 8°C y equilibre a temperatura ambiente antes de su uso (20-24°C).**
4. **265201 LSAPC2 Control positivo LSA de clase II (100 µL):** Esta mezcla de suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**
5. **265202 LSANC2 Control negativo LSA de clase II (100 µL):** Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase II. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA
PAULA
DIRECTORA

LC1683CEES Rev. B
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



B. Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico in vitro.
2. En los análisis realizados con métodos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration*) (FDA, por sus siglas en inglés), el material de origen humano utilizado en la producción de este kit ha resultado negativo para el VIH, el HCV y el HbsAg (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B). Aun así, ninguna prueba puede garantizar plenamente la ausencia de agentes infecciosos. Por lo tanto, cuando trabaje con estos materiales, **observe las precauciones universales**.
3. La sustitución de los componentes por otros distintos de los incluidos en este sistema puede conducir a resultados erróneos.
4. Los reactivos contienen como conservantes azida sódica al 0,1% que puede reaccionar con las conducciones de plomo y cobre, y formar azidas metálicas explosivas. Cuando elimine los materiales por el desagüe, utilice grandes cantidades de agua.
5. La contaminación bacteriana de las muestras o la presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas puede incrementar las uniones inespecíficas y dar resultados erróneos.
6. Este producto detecta anticuerpos IgG que pueden ser o no linfocitotóxicos.
7. No se prevé que el producto detecte anticuerpos de las inmunoglobulinas de las clases IgA o IgM.
8. Las decisiones clínicas que afectan el tratamiento de un paciente no se basan únicamente en la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos frente a HLA. Antes de un trasplante, se realiza sistemáticamente una prueba de histocompatibilidad cruzada.
9. Estos productos se han ideado para utilizarse con el aparato Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante.
10. Elimine todo el material después de su uso de conformidad con las normas locales.
11. Para más información, consulte las ficha(s) de datos de seguridad (MSDS).

C. Instrucciones de conservación

1. Consulte en las etiquetas del producto las indicaciones de conservación.
2. Las microesferas y el conjugado concentrado son SENSIBLES A LA LUZ. No exponga estos productos a la luz durante más de 3 horas.

D. Purificación o tratamiento necesario para su uso

1. Vea "Recogida y preparación de las muestras".
2. El conjugado concentrado debe diluirse 1:10, en un tampón de lavado, antes de su uso.

E. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbios o hayan sobrepasado la fecha de caducidad.
2. Elimine todos los controles positivos y negativos diluidos que no haya utilizado, así como el conjugado después de su uso.

EQUIPOS NECESARIOS

Aparato Luminex y plataforma XY (Lifecodes, número de referencia 888300, 888302)

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La muestra de sangre debe recogerse sin anticoagulantes y con una técnica aséptica, y analizarse mientras esté fresca, para minimizar las posibilidades de obtener reacciones positivas o negativas falsas debido a un almacenamiento incorrecto o a la contaminación de la muestra. Se debe guardar el suero a una temperatura de entre los 2°C y los 8°C, durante un periodo máximo de 48 horas. Si el suero va a estar almacenado durante más de 48 horas, debe congelarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C, por un periodo máximo de 2 años. Laboratorios individuales deben establecer y validar los métodos para almacenar suero durante más de dos años. Antes de almacenar o transportar el suero, es preciso separarlo de los eritrocitos. No congele y descongele repetidamente las muestras de suero.

No utilice sueros con contaminación microbiana, hemolizados, lipémicos o inactivados por calor, ya que pueden dar resultados incongruentes.

Antes del ensayo, todas las muestras deben agitarse en Vórtex y centrifugarse (30 segundos a 10.000 xg) para sedimentar la materia particulada existente.

PROCEDIMIENTO

A. Materiales suministrados (Véase REACTIVOS en la página 2 para obtener información más específica)

- Microesferas LSA
- Conjugado concentrado
- Tampón de lavado
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Hoja de registro
- Hoja de formato de placa

B. Materiales, reactivos y equipos necesarios, pero no suministrados (los de la lista o equivalentes)

- Pipetas ajustables de 5 µL – 50 µL con las puntas adecuadas
- Pipeta multicanal de 250 µL con las puntas correspondientes y cubeta para tampón
- Tubos de microcentrifugación de 1,5 mL para diluciones conjugadas
- Tubos de ensayo para las muestras del paciente y los controles
- Cronómetro
- Rotulador
- Placas de filtro MultiScreen de Millipore (Cat. n° MSBVN1210, MSBVN1250; Lifecodes Cat. n° 888633 o 888315-50)
- Sistema de vacío Multiscreen (Millipore Cat # MAVM 0960R, Qiagen Cat # 19504, Lifecodes Cat. n° 888315)
- Fluido del citómetro Luminex (Lifecodes Cat. n° 628005)
- Kits de calibración Luminex (Kit de calibración Luminex 100/200, Kit de verificación de rendimiento Luminex 100/200, Lifecodes Cat. n° 628018 y 628019, respectivamente)
- Agua destilada
- Plataforma rotatoria
- Cubiertas adhesivas de plástico (Corning, Cat. n° 6524 o 6579)

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se DEBE proceder con cuidado para no contaminar el tampón de lavado ni el reactivo del conjugado concentrado (anti-IgG humana). La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano neutralizará los anticuerpos anti-IgG humana y, consecuentemente, el análisis resultará erróneo.
- Se debe proceder con cuidado para controlar la intensidad del vacío. Una fuerte presión de vacío puede causar que las microesferas se unan a las membranas y el recuento de las microesferas sea erróneo.
- Se debe proceder con cuidado cuando se vierta mediante la pipeta dentro de la placa del filtro para que las microesferas no se adhieran a los pocillos de las microplacas. Las microesferas deben pipetearse cuidadosamente dentro del pocillo para que la punta de la pipeta no roce la membrana. Si la punta entra en contacto con la membrana, puede perforarla y el análisis resultará erróneo.
- Se deben tomar precauciones para que en las fases de incubación las microesferas no salpiquen y se adhieran a las paredes de los pocillos. Al realizar el análisis por primera vez, analice algunos controles positivos, negativos o de ambos tipos para determinar la velocidad óptima de la plataforma rotatoria o el agitador vórtex. Se ha comprobado que una velocidad de aproximadamente 200 rotaciones por minuto con un tamaño de órbita de 19mm es eficaz en algunos aparatos.
- La presencia de niveles significativos de anticuerpo no ligado una vez terminado el lavado, debido a un exceso de suero o a un lavado insuficiente, puede reducir la capacidad del análisis para detectar la IgG unida a las microesferas sensibilizadas y dar lugar a resultados erróneos.
- En cada análisis deben incluirse sueros control positivo y negativo que permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos
- El ensayo se valida con 10µL de suero (Protocolo 1) y 20µL de suero (Protocolo 2).

- Retire la mezcla de microesferas LSA del congelador y almacénela en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que se descongele. Luego, colóquela sobre hielo y protéjala de la luz. **NOTA: La mezcla de microesferas puede congelarse y descongelarse hasta por 6 veces sin que afecte su rendimiento, según se indica en el Uso Previsto.**
- Mientras mantiene los demás componentes a 2-8°C en la oscuridad hasta que los necesite, deje que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) antes de usarlo. Durante este tiempo utilice la hoja de formato de placa para asignar una posición en la placa a cada uno de los sueros y controles que va a analizar. Los sueros control suministrados con el kit se utilizan para mostrar un alosuero positivo con amplia reactividad y un suero negativo.
- Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtro con una cubierta de plástico adhesivo. Humedezca previamente los pocillos que va a utilizar con 100-300 µL de agua destilada. Entre 2 y 5 minutos después, retire el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío. (Para utilizarlo correctamente, consulte las recomendaciones del fabricante.)
- Prepare brevemente (30 segundos) las microesferas LSA centrifugando el vial a 600 – 800 xg para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agite bien en vórtex (-1 minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.
- Añada 40 µL de microesferas LSA a cada uno de los pocillos asignados. Mientras distribuye las microesferas, agite en vórtex cada 2 minutos el vial de las microesferas LSA para mantenerlas en suspensión, y luego añada 10 µL del suero del paciente y del suero de control (Protocolo 1) o 20 µL del suero del paciente y del suero de control (Protocolo 2) y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas resuspendidas para asegurar que se distribuyan suficientes microesferas en los pocillos y tiempos reducidos de recuento. Si las microesferas no se agitan intermitentemente en vórtex, se depositarán en el fondo del tubo. Esto causará que se dispense una cantidad diferencial de microesferas en los pocillos, lo cual puede afectar negativamente a los tiempos de ensayo y el análisis de los resultados.

- Cubra la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protéjala de la luz con papel de aluminio o en una caja. Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, los sueros control y las microesferas que no haya utilizado, para usos futuros. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a ≤- 65°C, las porciones que no haya utilizado de la mezcla de microesferas LSA, para usos futuros.
- Diluya el conjugado con tampón de lavado (5 µL de conjugado en 45 µL de tampón de lavado por muestra). Para compensar las pérdidas por pipeteo, es aconsejable preparar un (1) volumen extra de conjugado diluido. Cúbralo con papel de aluminio o consérvelo en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que lo utilice. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, el conjugado concentrado que no haya utilizado, para usos futuros.
- Tras los 30 minutos de incubación, retire la cubierta de plástico adhesivo y añada 100 µL de tampón de lavado a cada pocillo. Mezclar para volver a suspender las perlas y succionar ligeramente la placa.

PRECAUCIÓN: Si la intensidad de vacío es excesiva, las microesferas se adherirán a la membrana y puede causar que el análisis de la muestra fracase. Aplique la presión de vacío mínima necesaria para aspirar las muestras.

- Añadir 250 µL de Buffer de lavado a cada pozo, mezclar para volver a suspender las perlas, succionar y repetir dos veces más el procedimiento para realizar un total de tres lavados.

PRECAUCIÓN: Un lavado incompleto puede reducir la capacidad del conjugado de detectar IgG unida a microesferas sensibilizadas y conducir falsos negativos.

- Añada 50 µL de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Proteja la placa de la luz con papel de aluminio o en una caja. Colóquela en una plataforma rotatoria (a 200 rotaciones por minuto) o agítela suavemente en vórtex cada 5-10 minutos. Incúbela durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C).
- Con una punta de pipeta limpia, añada de 130 a 150 µL de tampón de lavado en cada pocillo y mezcle para resuspender las microesferas.
- Recolecte los datos con el aparato Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un retraso de más de 3 horas puede aumentar las probabilidades de obtener reacciones falsamente positivas o falsamente negativas. Vuelva a almacenar a 2-8°C el tampón de lavado que no haya utilizado, para usos futuros.



RESULTADOS

Introduzca los valores de Intensidad Mediana de Fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) cruda para cada microesfera en la hoja de registro específica del lote. Para determinar si una microesfera es positiva, primero determine si el valor de MFI de cada microesfera con antígeno unido es superior al umbral indicado en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit. Si el valor de MFI de una determinada microesfera con antígeno unido es superior al umbral, divida su MFI por el del antígeno de más baja clasificación (LRA, por sus siglas en inglés) del locus correspondiente, para obtener el cociente MFI/Antígeno de más baja clasificación (MFI/LRA). El LRA de cada locus es el valor de MFI de la microesfera con antígeno de más baja clasificación para ese locus.

Ejemplo : $\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "1"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "x" del locus "1"}$

$\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "2"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "y" del locus "2"}$

$\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "3"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "z" del locus "3"}$

Consulte en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit, la lista de antígenos presentes en cada microesfera, y el valor de corte para determinar el resultado positivo/negativo para cada microesfera con antígeno unido. Se considera que una microesfera con antígeno unido es positiva cuando el valor de MFI es superior al umbral de MFI y el cociente MFI/LRA es superior al valor de corte.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de LSA de clase I y clase II se desarrolla dentro del sistema de pruebas, incluyendo un suero control positivo y negativo. Estos sueros control deben incluirse con cada prueba que se realice para ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos de reactivos. Los sueros del control positivo reaccionarán con un número elevado de microesferas conjugadas con HLA dando lugar a un patrón similar al indicado en la hoja de registro específica del lote. Los sueros de control negativo reaccionarán con pocas o ninguna de las microesferas conjugadas con HLA dando lugar a valores de MFI cruda ≤ 1000 .

Los juegos de microesferas incluyen microesferas de control para verificar los resultados de cada muestra. La microesfera de control positivo está recubierta con IgG humana y debería indicar una MFI ≥ 10.000 con los sueros control. Si se obtienen valores de MFI inferiores a 10.000 con los sueros control, es probable que el lavado del ensayo haya sido insuficiente o que el conjugado no esté en buenas condiciones. Las muestras de pacientes muestran un amplio rango de reactividad con la microesfera de control positivo, pero siempre deberían generar una señal de MFI ≥ 10.000 . La microesfera de control negativo debería generar valores bajos de MFI con los sueros de control. Consulte en la hoja de registro específica del lote los límites observados para las microesferas de control con los sueros de control.

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del envase, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplen las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana de los materiales, incubaciones demasiado cortas, lavado o decantado insuficiente de las microesferas, exposición del conjugado a luz parásita u omisión de reactivos o etapas de la prueba.

La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobina en la muestra del paciente puede incrementar las uniones inespecíficas y producir resultados erróneos en este ensayo.

Los anticuerpos detectados por los kits LSA son aquellos reactivos dentro de la población de antígenos disponibles detallados en la hoja de registro.

Las glicoproteínas de un solo antígeno HLA, de clase I y II, de LIFECODES se obtuvieron de líneas de células que indicaban antígenos individuales HLA.

Algunos IgG con baja avidéz o título bajo, IgA, IgM y anticuerpos monoespecíficos contra antígenos no incluidos en el panel, no se detectarán con ensayos de un solo antígeno de LIFECODES.

Los títulos de anticuerpos del suero están específicamente relacionados al paciente y a momentos determinados. Si muchas microesferas están produciendo valores de MFI mayores de 15.000, puede ser necesario diluir los sueros para detectar mejor los anticuerpos IgG.

Debido a la complejidad del análisis de HLA, la interpretación de los datos debería ser revisada por personal cualificado. En la determinación de la especificidad de los anticuerpos con los kits LSA deben tenerse en cuenta los resultados de todas las microesferas, incluyendo aquellas iguales o similares al valor de corte. Puede ser útil el conocimiento del paciente y la comprensión de los grupos con reactividad cruzada para asignar la especificidad a un suero determinado.



HEMOMEDI S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Escaso número de microesferas	La mezcla de microesferas no está correctamente suspendida	Agítela en vórtex por pulsos para resuspenderla por completo
	Fallo del aparato – Mal equilibrado	Consulte el manual del aparato
	Fallo del aparato – Bloqueo del flujo de muestra	Consulte el manual del aparato
	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un nuevo kit
	Presión de vacío demasiado elevada/microesferas adheridas a la membrana	Reduzca la intensidad del vacío; para las placas de filtro MultiScreen de Millipore se recomienda un vacío de 271- 406 mb (203-305 mm Hg)
Se sobrepasa el umbral para la microesfera de control negativo (NC) con los sueros de control	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
No se alcanza el umbral para la microesfera de control positivo (PC) con los sueros de control	Conjugado en mal estado (p.ej., fotoblanqueo)	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
No se alcanza el umbral para la microesfera de control positivo (PC) con la muestra del paciente	Conjugado en mal estado (p.ej., fotoblanqueo)	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Muestra agregada incorrecta	Repita con la muestra control correcta
Resultado anómalo para el suero control positivo	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados para asegurar que las microesferas se resuspenden correctamente
Asignación positiva para los sueros de control negativo (> 2 microesferas conjugadas con HLA) o MFI >10.000	Contaminación de la mezcla de microesferas, el tampón de lavado, los sueros de control negativo o el conjugado concentrado con muestra positiva	Reduzca la intensidad del vacío
		Utilice un nuevo kit
Placa de filtro obstruida	Materia particulada en la muestra	Centrifugue la muestra durante aproximadamente 5 minutos a 8.000 – 12.000 xg

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuando se utiliza el kit LIFECODES LSA siguiendo el procedimiento descrito, el resultado revela la presencia o la ausencia de anticuerpos IgG HLA. Para el ensayo clínico se usaron los valores de corte estándar de LABScreen, de modo que se consideraron positivas las puntuaciones > 4.

LSA Clase I

El kit LIFECODES LSA Clase I mostró una copositividad del 93,7 % (93,4 %) para 151 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class I- Combi, Cat. n° LS1A04 (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

LSA Clase II

El kit LIFECODES LSA Clase II mostró una copositividad del 90,5 % (89,9 %) para 150 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class II- Group 1, Cat. n° LS2A01 (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

REFERENCIAS

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

REPRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32 D-63303 Dreieich, Alemania
Teléfono: +49 (0) 6103 80560, Fax: +49 (0) 6103 8056199

Servicio técnico para Europa: +32/3 385 47 91

Publicación: 2017-03-27

La documentación del producto y las traducciones están disponibles en: WWW.IMMUCOR.COM

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

Detección del C3d de LIFECODES®

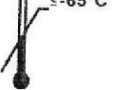
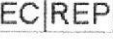
Para utilizarse en diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos.....	1	Recogida y preparación de muestras.....	3
Uso previsto.....	1	Instrucciones de uso.....	3
Resumen y explicación.....	1	Resultados.....	4
Principios del procedimiento.....	1	Control de calidad.....	4
Reactivos suministrados.....	2	Limitaciones del procedimiento.....	5
A. Identificación y condiciones de almacenamiento.....	2	Resolución de problemas.....	5
B. Advertencias o precauciones.....	2	Características específicas del rendimiento.....	5
C. Purificación o tratamiento para el uso..	2	Referencias	6
D. Indicaciones de inestabilidad.....	2	Fabricante y representante autorizado....	6
Materiales necesarios pero no suministrados.....	2		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas de los productos y documentos complementarios)

Código del lote		Número de catálogo		Fecha límite de uso		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Fabricante		Sensible a la luz (Mantenga alejado de la luz)		Temperatura (almacenamiento)		Cantidad suficiente para N pruebas	
Representante autorizado en la Comunidad Europea		Advertencia					

USO PREVISTO

El kit de detección del C3d LIFECODES® es un equipo de análisis cualitativo para detectar el complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos del suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Este producto se ha diseñado para detectar el complemento C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

Este producto contiene el anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE, microesferas de control positivo y un complemento con sueros humanos y un tampón de lavado.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Una parte alícuota de los antígenos HLA vinculados a las microesferas se deja incubar con un pequeño volumen de muestra de suero de prueba. Después de esta incubación inicial, se agrega un reactivo de suero negativo como fuente de complemento para una incubación adicional. Las microesferas sensibilizadas se lavan posteriormente para quitar el anticuerpo no vinculado. Se agrega después un anticuerpo contra el C3d humano conjugado con ficoeritrina. Después de otra incubación, se lava la muestra de prueba, se diluye y se



analiza con el instrumento Luminex. La intensidad de la señal de cada microesfera de la muestra de prueba se compara con la intensidad de la señal de los sueros de control negativo con el fin de determinar si la muestra se considera positiva o negativa para el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

A. Identificación y condiciones de almacenamiento

Número del producto de detección del C3d: 265400

1. **C3dCJ** Conjugado del C3d (número de pieza: 265410; 1200 µL). Anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE en un tapón de almacenamiento de base fosfatada, listo para utilizarse, que contiene NaCl, Tween-20 y azida de sodio. SENSIBLE A LA LUZ. Mantenga alejado de la luz directa durante períodos prolongados. **Almacene a 2 - 8 °C en la oscuridad hasta 3 meses o a ≤-65 °C hasta la fecha de caducidad.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces a ≤-65 °C después de la descongelación inicial.
2. **C3dCS** Suero de complemento (número de pieza: 265415; 2 frascos de 360 µL). Suero de donante varón al que no se ha realizado transfusión. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 4 veces después de la descongelación inicial.
3. **C3dPCB** Microesfera de control positivo del C3d (número de pieza: 265405; 24 µL). El tapón de almacenamiento es de base fosfatada y contiene NaCl, Tween-20, azida de sodio y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces después de la descongelación inicial.
4. **LMWB** Tapón de lavado (número de pieza: 628221; 30 mL). Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. **Consérvelo a 2-8°C** y equilibrelo con la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de usarlo.

B. Advertencias o precauciones

1. Para utilizarse en diagnóstico *in vitro*
2. El material de origen humano usado para producir este kit se ha sometido a pruebas y los resultados son negativos para anticuerpos del VIH, VHC y HBsAg según los métodos aprobados por la Dirección de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer la certeza absoluta de que no hay agentes infecciosos. Por tanto, **siga las «precauciones universales»** cuando trabaje con estos materiales.
3. Los reactivos contienen un 0,1 % de azida de sodio como agente conservante, que puede reaccionar con los elementos de fontanería de plomo y cobre para formar azidas metálicas explosivas. Utilice grandes cantidades de agua cuando deseche materiales por un fregadero.
4. La contaminación bacteriana de las muestras o la existencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina pueden causar un aumento de los vínculos no específicos y generar resultados erróneos.
5. Después de utilizarlos, deseche todos los materiales según las normativas locales.
6. Consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales para obtener información adicional.
7. En los sueros de complemento almacenados a 2 - 8 °C durante períodos largos se ha observado que la actividad del complemento se reduce.
8. Las microesferas y el conjugado son SENSIBLES A LA LUZ. La exposición a la luz que exijan las actividades rutinarias se limitará a un máximo de tres horas.

C. Purificación o tratamiento necesario para el uso

1. Véase "Recogida y preparación de muestras".
2. Todos los componentes están listos para su uso y no se requiere ninguna dilución.

D. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbidos o cuya fecha de caducidad haya vencido.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS necesarios pero NO SUMINISTRADOS

- Kits LIFECODES LSA clase I (número de pieza: 265100, LSA1) o LIFECODES LSA clase II (número de pieza: 265200, LSA2).
- Equipo necesario para realizar los análisis LIFECODES LSA clase I o clase II de (véase el folleto informativo correspondiente, LC1683CEES).

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DEL SUERO

Se debe recoger sangre sin anticoagulante, utilizando una técnica aséptica, y se debe someter a las pruebas mientras esté reciente o se debe almacenar apropiadamente con el fin de reducir al máximo la posibilidad de reacciones de falsos positivos o de falsos negativos debidas a un almacenamiento inadecuado o a la contaminación de la muestra. El suero debe almacenarse a 2 - 8 °C hasta un máximo de 48 horas. Si el suero ha de almacenarse durante más de 48 horas, debe congelarse a -20 °C o menos, o a -80 °C si se ha de conservar hasta 2 años. Los laboratorios individuales deben establecer y validar métodos para almacenar sueros durante más de 2 años. El suero debe separarse de los glóbulos rojos cuando se almacena o transporta. Evite congelar y descongelar de manera repetida las muestras de suero.

PRECAUCIÓN: No utilice sueros contaminados microbiológicamente, hemolizados o lipémicos, ya que estos pueden producir resultados incoherentes.

Antes de los análisis, se deben agitar brevemente en vórtice y centrifugar todas las muestras (30 segundos a $\approx 10\,000g$) para sedimentar cualquier material particulado que pueda estar presente.

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se DEBE tener cuidado para evitar la contaminación del tapón de lavado y del reactivo contra el C3d humano. La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano puede producir posteriormente un error en la prueba.
- Una muestra de sueros de control positivo y negativo se debe incluir con cada prueba con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo.
- El suero de complemento es un reactivo de suero negativo necesario para el análisis de detección del C3d como fuente estándar de complemento.
- Además, siga las precauciones generales descritas en el folleto informativo del producto LIFECODES LSA (LC1683CEES).

1. Encienda el instrumento Luminex con el fin de permitir un calentamiento de 30 minutos.
2. Retire la mezcla de microesferas LSA, la microesfera de control positivo del C3d (C3dPCB), el suero de complemento del C3d (C3dCS) y el conjugado del C3d (C3dCJ) del congelador de -65 °C y almacene en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se descongelen. Después de descongelar, coloque inmediatamente en hielo y proteja de la luz.
3. Permita que el tapón de lavado alcance la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de utilizarse. En este período, utilice la hoja de formato de la placa (LC979) para asignar una posición en placa para cada suero y para los controles que se analizarán. **Los sueros de control negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2) se usan como control negativo.**
4. Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtros con una cubierta plástica adhesiva. Humedezca previamente los pocillos que se utilizarán con 100-300 μL de agua destilada. Después de 2-5 minutos, quite el agua mediante una aspiración delicada utilizando un colector de vacío. (Véanse las recomendaciones del fabricante para conocer el uso adecuado.)
5. Prepare las microesferas LSA centrifugando el frasco brevemente (30 segundos) a $\approx 600 - 800 \times g$ con el fin de retirar cualquier microesfera o líquido de la tapa o paredes del frasco. Agite en vórtice por completo (≈ 1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme. En otro frasco combine 1 μL /muestra de C3dPCB con el volumen apropiado de microesferas LSA (40 μL /muestra). Agite en vórtice por completo (≈ 1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme.
6. Agregue 40 μL de la mezcla de microesferas LSA con C3dPCB a cada pocillo asignado. Agite en vórtice el frasco de microesferas LSA cada 2 minutos para mantener las microesferas en suspensión a la vez que estas se distribuyen. Centrifugue el suero (30 segundos a $\approx 10,000 \times g$) y agregue 10 μL de suero o suero de control y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas nuevamente suspendidas para garantizar que se distribuyen suficientes microesferas en los pocillos y lograr unos periodos reducidos de recuento de microesferas. Si no se agitan en vórtice las microesferas de manera intermitente, esto hará que las microesferas se asienten en la parte inferior del tubo. De esta manera, se dispensarían las microesferas en cantidades diferenciales en pocillos, lo que podría afectar de manera adversa a los tiempos de ejecución y al análisis de los resultados.

7. Cubra la placa con una cubierta plástica adhesiva y a continuación coloque láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) en la oscuridad en una plataforma giratoria (200 rotaciones por minuto). Vuelva a colocar las partes no usadas de los sueros de control en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro. Vuelva a colocar las partes no usadas de la mezcla de microesferas LSA y C3dPCB en el lugar de almacenamiento a una temperatura de ≤ -65 °C en la oscuridad para uso futuro.
8. Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 30 μL de C3dCS a cada pocillo incluyendo el de control negativo. Vuelva a colocar el **C3dCS en el lugar de almacenamiento a ≤ -65 °C inmediatamente después del uso.** Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una



plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5-10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 – 24 °C).

- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.

PRECAUCIÓN: Si se usa una fuerza de aspiración excesiva, esto hará que las microesferas se adhieran a la membrana y producirá un fallo de la muestra. Aplique la presión mínima de vacío necesaria para aspirar las muestras.

- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo, aspire y repita tres veces más.

PRECAUCIÓN: Si no se lava por completo, se puede reducir la capacidad del conjugado de detectar el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos y los resultados producidos pueden ser falsos negativos.

- Centrifugue el C3dCJ durante 30 segundos en una microcentrifugadora (≈600 – 800 x g). El C3dCJ está listo para su uso y no se necesita ninguna dilución. Agregue 50 µL de C3dCJ a cada pocillo. Almacene el C3dCJ restante a 4 °C durante un máximo de tres meses o almacénelo a ≤-65°C hasta la fecha de caducidad.
- Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5 - 10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 24°C).
- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.
- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo y aspire.
- Utilice una punta de pipeta limpia, agregue 200 µL de tapón de lavado en cada pocillo y mezcle para volver a suspender las microesferas.
- Recabe los datos con el instrumento Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilice una plantilla de C3d de Luminex (consulte la documentación de LIFECODES LSA para conocer información específica del lote). Los retrasos mayores a 3 horas a temperatura ambiente pueden aumentar la posibilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos. Vuelva a colocar las partes no usadas del tapón de lavado en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro.

RESULTADOS

Detección del C3d: Para analizar los resultados de un lote de muestras:

- Cree una hoja de cálculo en Excel abriendo una copia del archivo de resultados en formato CSV con los resultados del lote de Luminex y "Guarde como" archivo de Excel. Se utilizará este archivo para los cálculos necesarios para analizar los resultados.
- Copie, de la hoja de cálculo de registro específica para el lote incluida en el kit LSA, el nombre del antígeno que corresponde a cada microesfera.
- Después, reste los valores la MFI del suero de control negativo (MFI del suero de control negativo) de la MFI no procesada para cada microesfera individual con el fin de calcular la MFI ajustada al contexto.

(a) $MFI \text{ ajustada al contexto} = MFI \text{ de una muestra} - MFI \text{ del suero de control negativo}$

- A continuación, divida la MFI ajustada al contexto entre la MFI del control calculada (CalcCON) de su lugar respectivo para generar la proporción corregida para el contexto (BCR-Neg). El CalcCON de cada lugar es el valor de la MFI no procesada de la microesfera con el antígeno de menor categoría de ese lugar.

(b) $BCR-Neg = \frac{MFI \text{ ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El menor valor de MFI no procesada del lugar}}$

- Por último, divida la MFI ajustada al contexto del antígeno entre el valor correspondiente de la MFI del antígeno para el suero de control negativo LSA (NC) con el fin de generar la fuerza relativa (fuerza R).

(c) $Fuerza R = \frac{MFI \text{ ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El valor de la MFI no procesada del antígeno}}$

Se considera positiva una microesfera si dos o más de los valores ajustados están por encima de los valores límite. Consulte el certificado de análisis del producto de detección del C3d (265400) para conocer los límites predeterminados positivos y negativos. Al ajustar estos límites se pueden obtener sensibilidades mayores o menores.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de la detección del C3d está incorporado en el sistema de pruebas gracias a la inclusión de la microesfera de control positivo y del suero de control positivo y negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2). Estos controles deben incluirse en cada

análisis con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo. El suero de control positivo reaccionará con una serie de microesferas conjugadas LSA para generar un patrón similar al del gráfico de detección del C3d. El suero de control negativo reaccionará con solo unas pocas microesferas conjugadas LSA, e incluso podría no reaccionar. La microesfera de control positivo del C3d debería generar valores de la MFI $\geq 10\ 000$, con un análisis en que se utilice el suero de control negativo. Los valores de muestras menores que 10 000 pueden indicar que no se ha agregado suficiente cantidad de C3dCJ, que se ha lavado deficientemente el material de análisis o que la calidad de C3dCJ se ha visto afectada. El recuento de microesferas debería ser de por lo menos 40 reacciones.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden darse resultados erróneos por la contaminación bacteriana de los materiales de pruebas, períodos inadecuados de incubación, el lavado inapropiado o la decantación de microesferas, la exposición de C3dCJ a luz dispersa o la omisión de reactivos o pasos en los análisis.

La presencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina en la muestra de sueros puede producir un aumento de vínculos no específicos y generar resultados erróneos de este análisis.

Los valores de los anticuerpos de los sueros son específicos de períodos y muestras. Si muchas microesferas producen valores de la MFI mayores que 15 000, podría ser necesario diluir los sueros.

Debido a la naturaleza compleja de las pruebas de los HLA y a los diversos factores que podrían afectar la cascada de complementos que conduce a la formación del C3d, los resultados se deben revisar e interpretar por parte de personas capacitadas. El uso de cualquier suero de control y de valores límite diferentes a aquellos suministrados en el certificado de análisis no ha sido validado.

Esta prueba no puede usarse como la única base para las decisiones clínicas.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

(Consulte también el folleto informativo de los productos LSA clase I y clase II de LIFECODES, LC1683CEES).

PROBLEMA	CAUSA POSIBLE	SOLUCIÓN
Bajo recuento de microesferas, solo para C3dPCB	No se agregaron suficientes microesferas a la mezcla de microesferas LSA	Vuelva a suspender completamente generando un vórtice breve, evite las pipetas de $<3\ \mu\text{L}$. Utilice pipetas calibradas.
	Fallos del instrumento - no se calibra correctamente	Vea el manual de Luminex
Valores de la MFI de control positivo del C3d con suero $<10\ 000$	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un frasco nuevo de C3dPCB
	Se agregó C3dCJ fotoblanqueado o insuficiente a la reacción	Repita el análisis. Utilice un frasco nuevo de C3dCJ
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
Baja MFI para el suero de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	No se agregó suficiente C3dCJ a la reacción.	Repita el análisis con la cantidad correcta de C3dCJ.
	No se agregó suficiente C3dCS o no se agregó ningún C3dCS a la reacción.	Repita el análisis agregando C3dCS.
	Baja temperatura de análisis	Confirme que el análisis se realiza a 20°C - 24°C . Intente realizarlo en el límite superior de temperatura para lograr una MFI mayor.
Patrón anómalo para los sueros de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
MFI alta para los sueros de control negativo (>1500)	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados para garantizar que las microesferas se vuelven a suspender durante el lavado.
		Disminuya la potencia de aspiración.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

Cuando se utiliza el equipo de detección del C3d de LIFECODES según el procedimiento descrito anteriormente, los resultados revelan la presencia o ausencia del complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

Se realizó un estudio utilizando 142 muestras que comparaba la detección de C3d de LIFECODES y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC por sus siglas en inglés). Para este juego de muestras, la sensibilidad de la detección del C3d de LIFECODES era



mejor que la de la prueba de CDC para la detección del complemento de vínculo del anticuerpo HLA en muestras de suero positivo, según se desprende de los análisis LSA de las clases I y II de LIFECODES.

REFERENCIAS

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. y Clavien P.A. What's Hot, What's New at WTC—Clinical Science. *Am J Transplant*. 2015; 15(2): 327-332.
4. Lan, J. et al. Clinical Relevance of C3d-Binding Donor-Specific Antibodies in Late Kidney Allograft Failure. *Am J Transplant*. 2015; 15(S3).
5. Lan, J. et al. Complement-Fixing Donor-Specific HLA Antibodies Detected By Novel C3d Assay Are Associated With Antibody Mediated Rejection in Heart Transplant Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2015; 34(4): S130.
6. Toutirais, O. et al. Clinical outcome of heart transplant recipients with complement binding donor specific antibodies. *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 431.
7. Dubois, V. et al. Pregnancy and Donor-Specific HLA-antibody-mediated humoral rejection in young women after liver transplantation: "Liaisons Dangereuses"? *Tissue Antigens*. 2015; 85(5): 306.
8. Wahrmann, M. et al. Modified solid-phase alloantibody detection for improved crossmatch prediction. *Human Immunol*, 2013; 74(1): 32-40.
9. Sacks, S.H. and Zhou, W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nature Rev Immunol*, 2012; 12(6): 431-442.
10. Gieriej, 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.

REPRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Strasse 32, 63303 Dreieich, Germany

Servicio Técnico Europeo: +32/3 385 47 91

Emitido: 2017-02-23





(01)10888234400349



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES LSATM CLASS II

Box 1 of 2

LSA2
REF 265200
LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD

LSAPC2	265201	Box 1
LSANC2	265202	
LMWB	628221	
LSACJ	265010	
LSA2B	265203	Box 2

EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



IVD ! KEEP AWAY FROM LIGHT 24

265200LB Rev. A

ROTULO ORIGINAL

HEMOMEDI

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



0110888234400332



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES LSATM CLASS I

Box 1 of 2

LSA1

REF 265100

LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD

LSAPC1 265101

Box 1

LSANC1 265102

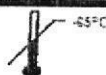
LMWB 628221

LSACJ 265002



LSA1B 265103

Box 2



FC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany

IVD



KEEP AWAY
FROM LIGHT



265100LB Rev. A

ROTULO ORIGINAL

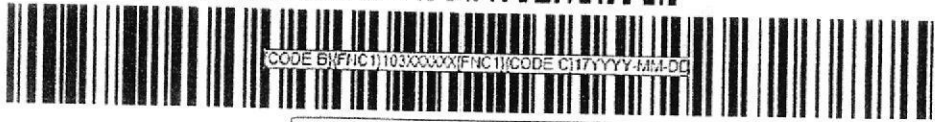
HEMOMEL[®]
DIRETOR

HEMOMEL[®] S.R.L.

GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



(01)10888234400486



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES C3d DETECTION Box 1 of 2

C3d

REF 265400

LOT 3XXXXXX

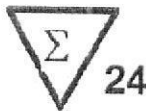
 YYYY-MM-DD

	C3dPCB	265405	Box 1: 265420-24
2X	C3dCS	265415	 -65°C
	C3dCJ	265410	

Box 2: 628221 **LMWB** Shipped Separately

EC **REP**

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



IVD



265400LB Rev. A

KEEP AWAY FROM LIGHT

ROTULO ORIGINAL

HEMOMEL
PA
Director
N. 12 m.

HE-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

SOBREROTULO

HemoMedica

Importado por:

Hemomedica S.R.L.

California 2082, Piso 2, Of 217, CABA

Argentina

"Autorizado por ANMAT PM 1049-64"

DT: Ana Paula Zucchini. M.N. 12855

HEMOMEDICA
Diferencia 12 N.º

HA 2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

Documentación del producto y traducciones disponibles en: www.immucor.com

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

LIFECODES Clase I LSA™: es un ensayo cribado de Luminex® para detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA de clase I.

LIFECODES Clase II LSA™: es un ensayo cribado de Luminex® para detectar anticuerpos IgG reactivos al panel frente a moléculas HLA de clase II.

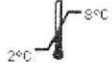
Para diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos.....	1	Procedimiento.....	3
Uso.....	2	A. Materiales suministrados.....	3
Resumen y explicación.....	2	B. Materiales necesarios, pero no suministrados.....	3
Principios del procedimiento.....	2	Instrucciones de uso.....	4
Reactivos.....	2	Resultados.....	5
A. Identificación.....	2	Control de calidad.....	5
B. Advertencias y precauciones.....	3	Limitaciones del procedimiento.....	5
C. Instrucciones de conservación.....	3	Resolución de problemas.....	6
D. Purificación o tratamiento para su uso.....	3	Características específicas de rendimiento.....	6
E. Indicaciones de inestabilidad.....	3	Referencias.....	6
Equipos necesarios.....	3		
Recogida y preparación de las muestras.....	3		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas del producto y documentación suplementaria)

Código de lote	LOT	Número de referencia	REF	Fecha de caducidad		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Muestra	SAMPLE	Fabricante		Umbral de MFI	MFI TH	Temperatura (almacenamiento)	
Diluciones de suero	DIL	Fotosensible (Proteger de la luz)		Suficiente para N pruebas		Consulte las instrucciones de uso	
Nombre del paciente	NAME	Número de identificación	ID#	Fecha	DATE	Técnico	TECH
Microesfera	BEAD	Clase I	CLI	Clase II	CLII	Valor de corte	CUT-OFF
Fondo	BKG	Antígeno	AG	La mediana de la intensidad de la fluorescencia	MFI	Interpretación	INTRP
Microesfera de control negativo	NC	Microesfera de control positivo (Immunoglobulina G)	PC	Fecha de extracción de la muestra	BDT	Identificación del antígeno	ANTIGEN ID
Antígeno de más baja clasificación	LRA	MFI / Antígeno de más baja clasificación	MFI/LRA	Advertencia		Límites observados	OBSERVED LIMITS
Densidad de antígeno relativa	RAD	Equivalente serológico	SERO				

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

USO

LIFECODES Clase I y Clase II LSA™ son inmunoensayos basados en microesferas que se utilizan para detectar cualitativamente anticuerpos IgG frente a antígenos HLA.



RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los antígenos leucocíticos humanos (HLA) constituyen un sistema de glicoproteínas que desempeña un papel funcional en la presentación de péptidos al sistema inmunitario.^{1,2} Sin embargo, por tratarse de un sistema muy polimórfico, las moléculas HLA pueden convertirse en el blanco de respuestas humorales (de anticuerpos) durante el embarazo, la transfusión de hemoderivados o el rechazo a trasplantes de órganos. Por lo general, la aloinmunización conduce a la producción de anticuerpos anti-HLA aproximadamente en el 33% de los individuos expuestos.³ La presencia o ausencia de estos anticuerpos específicos anti-HLA es uno de los factores que determinan la supervivencia de los alotrasplantes.⁴

Las microesferas LIFECODES Clase I LSA™ se han ideado para detectar anticuerpos IgG frente a las glicoproteínas de HLA de clase I. LIFECODES Clase I LSA™ se compone de microesferas Luminex específicas conjugadas a glicoproteínas de HLA de clase I purificadas por afinidad.

Las microesferas LIFECODES Clase II LSA™ se han ideado para detectar anticuerpos IgG frente a las glicoproteínas de HLA de clase II. LIFECODES Clase II LSA™ se compone de microesferas Luminex específicas conjugadas a glicoproteínas de HLA de clase II purificadas por afinidad.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Se deja incubar una alícuota de las microesferas con un pequeño volumen de la muestra de suero problema. Seguidamente, se lavan las microesferas sensibilizadas para eliminar los anticuerpos que no se hayan fijado. Se añade luego un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina. Tras otra incubación, se diluye la muestra problema y se analiza en el aparato Luminex. Se compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la de la microesfera específica del locus de más baja calificación incluida en la preparación, para determinar si aquella es positiva o negativa en cuanto al aloanticuerpo unido.

REACTIVOS

A. Identificación

265100: **LSA1** LIFECODES Clase I LSA™ consiste en cinco (5) componentes en cantidad suficiente para llevar a cabo 24 ensayos.

- 265103 **LSA1B Mezcla de microesferas LSA de clase I** (960 µL): Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase I más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. **Consérvelo por debajo de ≤ -65°C en la oscuridad.**
- 265002 **LSACJ Conjugado concentrado LSA** (120µL): Reserva de anticuerpos caprinos anti-IgG humana conjugados con ficoeritrina en un tampón fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20 y azida sódica. **DIL DEBE DILUIRSE 1:10 en tampón de lavado antes de su uso. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante períodos de tiempo prolongado. Consérvelo a 2-8°C en la oscuridad.**
- 628221 **LMWB Tampón de lavado LIFECODES** (30 mL): Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y albúmina de suero bovino. **Consérvelo a entre 2 y 8°C y equilibre a temperatura ambiente antes de su uso (20-24°C).**
- 265101 **LSAPC1 Control positivo LSA de clase I** (100 µL): Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**
- 265102 **LSANC1 Control negativo LSA de clase I** (100 µL): Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase I. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**

265200: **LSA2** LIFECODES Clase II LSA™ consiste en cinco (5) componentes en suficiente cantidad para 24 ensayos.

- 265203 **LSA2B Mezcla de microesferas LSA de clase II** (960 µL): Mezcla de microesferas, cada una conjugada con una diferente glicoproteína de HLA de clase II más microesferas de control. El tampón de almacenamiento es un tampón de fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga, de forma rutinaria, el producto a la luz durante más de tres horas. **Consérvelo por debajo de ≤ -65°C en la oscuridad.**
- 265010 **LSACJ Conjugado concentrado LSA** (120µL): Reserva de anticuerpos caprinos anti-IgG humana conjugados con ficoeritrina en un tampón de fosfato de almacenamiento que contiene NaCl, Tween-20 y azida sódica. **DIL DEBE DILUIRSE 1:10 en tampón de lavado antes de su uso. SENSIBLE A LA LUZ. No exponga el producto a la luz durante períodos de tiempo prolongado. Consérvelo a 2-8 °C en la oscuridad.**
- 628221 **LMWB Tampón de lavado LIFECODES** (30 mL): Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y albúmina de suero bovino. **Consérvelo a entre 2 y 8°C y equilibre a temperatura ambiente antes de su uso (20-24°C).**
- 265201 **LSAPC2 Control positivo LSA de clase II** (100 µL): Esta mezcla de suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se ha demostrado que están aloinmunizados a los antígenos de HLA y reaccionarán con la mayoría de las microesferas LSA de clase II. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**
- 265202 **LSANC2 Control negativo LSA de clase II** (100 µL): Esta mezcla del suero o de los sueros se obtiene de los individuos que se sabe que no tienen ningún anticuerpo contra antígenos HLA y reaccionarán con unas pocas, o ninguna, de las microesferas LSA de clase II. Contiene azida sódica al 0,1% como conservante. **Consérvelo a 2-8°C.**

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA
PÁG. 34 de 49

LC1683CEES Rev. B
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



B. Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico in vitro.
2. En los análisis realizados con métodos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*United States Food and Drug Administration*) (FDA, por sus siglas en inglés), el material de origen humano utilizado en la producción de este kit ha resultado negativo para el VIH, el HCV y el HbsAg (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B). Aun así, ninguna prueba puede garantizar plenamente la ausencia de agentes infecciosos. Por lo tanto, cuando trabaje con estos materiales, **observe las precauciones universales**.
3. La sustitución de los componentes por otros distintos de los incluidos en este sistema puede conducir a resultados erróneos.
4. Los reactivos contienen como conservantes azida sódica al 0,1% que puede reaccionar con las conducciones de plomo y cobre, y formar azidas metálicas explosivas. Cuando elimine los materiales por el desagüe, utilice grandes cantidades de agua.
5. La contaminación bacteriana de las muestras o la presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas puede incrementar las uniones inespecíficas y dar resultados erróneos.
6. Este producto detecta anticuerpos IgG que pueden ser o no linfocitotóxicos.
7. No se prevé que el producto detecte anticuerpos de las inmunoglobulinas de las clases IgA o IgM.
8. Las decisiones clínicas que afectan el tratamiento de un paciente no se basan únicamente en la determinación de la presencia o ausencia de anticuerpos frente a HLA. Antes de un trasplante, se realiza sistemáticamente una prueba de histocompatibilidad cruzada.
9. Estos productos se han ideado para utilizarse con el aparato Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante.
10. Elimine todo el material después de su uso de conformidad con las normas locales.
11. Para más información, consulte las ficha(s) de datos de seguridad (MSDS).

C. Instrucciones de conservación

1. Consulte en las etiquetas del producto las indicaciones de conservación.
2. Las microesferas y el conjugado concentrado son SENSIBLES A LA LUZ. No exponga estos productos a la luz durante más de 3 horas.

D. Purificación o tratamiento necesario para su uso

1. Vea "Recogida y preparación de las muestras".
2. El conjugado concentrado debe diluirse 1:10, en un tampón de lavado, antes de su uso.

E. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbios o hayan sobrepasado la fecha de caducidad.
2. Elimine todos los controles positivos y negativos diluidos que no haya utilizado, así como el conjugado después de su uso.

EQUIPOS NECESARIOS

Aparato Luminex y plataforma XY (Lifecodes, número de referencia 888300, 888302)

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La muestra de sangre debe recogerse sin anticoagulantes y con una técnica aséptica, y analizarse mientras esté fresca, para minimizar las posibilidades de obtener reacciones positivas o negativas falsas debido a un almacenamiento incorrecto o a la contaminación de la muestra. Se debe guardar el suero a una temperatura de entre los 2°C y los 8°C, durante un periodo máximo de 48 horas. Si el suero va a estar almacenado durante más de 48 horas, debe congelarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C, por un periodo máximo de 2 años. Laboratorios individuales deben establecer y validar los métodos para almacenar sera durante más de dos años. Antes de almacenar o transportar el suero, es preciso separarlo de los eritrocitos. No congele y descongele repetidamente las muestras de suero.

No utilice sueros con contaminación microbiana, hemolizados, lipémicos o inactivados por calor, ya que pueden dar resultados incongruentes.

Antes del ensayo, todas las muestras deben agitarse en Vórtex y centrifugarse (30 segundos a 10.000 xg) para sedimentar la materia particulada existente.

PROCEDIMIENTO

A. Materiales suministrados (Véase REACTIVOS en la página 2 para obtener información más específica)

- Microesferas LSA
- Conjugado concentrado
- Tampón de lavado
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Hoja de registro
- Hoja de formato de placa

B. Materiales, reactivos y equipos necesarios, pero no suministrados (los de la lista o equivalentes)

- Pipetas ajustables de 5 µL – 50 µL con las puntas adecuadas
- Pipeta multicanal de 250 µL con las puntas correspondientes y cubeta para tampón
- Tubos de microcentrifugación de 1,5 mL para diluciones conjugadas
- Tubos de ensayo para las muestras del paciente y los controles
- Cronómetro
- Rotulador
- Placas de filtro MultiScreen de Millipore (Cat. n° MSBVN1210, MSBVN1250; Lifecodes Cat. n° 888633 o 888315-50)
- Sistema de vacío Multiscreen (Millipore Cat # MAVM 0960R, Qiagen Cat # 19504, Lifecodes Cat. n° 888315)
- Fluido del citómetro Luminex (Lifecodes Cat. n° 628005)
- Kits de calibración Luminex (Kit de calibración Luminex 100/200, Kit de verificación de rendimiento Luminex 100/200, Lifecodes Cat. n° 628018 y 628019, respectivamente)
- Agua destilada
- Plataforma rotatoria
- Cubiertas de placa

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se DEBE proceder con cuidado para no contaminar el tampón de lavado ni el reactivo del conjugado concentrado (anti-IgG humana). La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano neutralizará los anticuerpos anti-IgG humana y, consecuentemente, el análisis resultará erróneo.
- Se debe proceder con cuidado para controlar la intensidad del vacío. Una fuerte presión de vacío puede causar que las microesferas se unan a las membranas y el recuento de las microesferas sea erróneo.
- Se debe proceder con cuidado cuando se vierta mediante la pipeta dentro de la placa del filtro para que las microesferas no se adhieran a los pocillos de las microplacas. Las microesferas deben pipetarse cuidadosamente dentro del pocillo para que la punta de la pipeta no roce la membrana. Si la punta entra en contacto con la membrana, puede perforarla y el análisis resultará erróneo.
- Se deben tomar precauciones para que en las fases de incubación las microesferas no salpiquen y se adhieran a las paredes de los pocillos. Al realizar el análisis por primera vez, analice algunos controles positivos, negativos o de ambos tipos para determinar la velocidad óptima de la plataforma rotatoria o el agitador vórtex. Se ha comprobado que una velocidad de aproximadamente 200 rotaciones por minuto con un tamaño de órbita de 19mm es eficaz en algunos aparatos.
- La presencia de niveles significativos de anticuerpo no ligado una vez terminado el lavado, debido a un exceso de suero o a un lavado insuficiente, puede reducir la capacidad del análisis para detectar la IgG unida a las microesferas sensibilizadas y dar lugar a resultados erróneos.
- En cada análisis deben incluirse sueros control positivo y negativo que permiten determinar si se ha producido un error técnico o un fallo de los reactivos
- El ensayo se valida con 10µL de suero (Protocolo 1) y 20µL de suero (Protocolo 2).

- Retire la mezcla de microesferas LSA del congelador y almacénala en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que se descongele. Luego, colóquela sobre hielo y protéjala de la luz. **NOTA: La mezcla de microesferas puede congelarse y descongelarse hasta por 6 veces sin que afecte su rendimiento, según se indica en el Uso Previsto.**
- Mientras mantiene los demás componentes a 2-8°C en la oscuridad hasta que los necesite, deje que el tampón de lavado se equilibre con la temperatura ambiente (entre 20 y 24°C) antes de usarlo. Durante este tiempo utilice la hoja de formato de placa para asignar una posición en la placa a cada uno de los sueros y controles que va a analizar. Los sueros control suministrados con el kit se utilizan para mostrar un alosuero positivo con amplia reactividad y un suero negativo.
- Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtro con una cubierta de plástico adhesivo. Humedezca previamente los pocillos que va a utilizar con 100-300 µL de agua destilada. Entre 2 y 5 minutos después, retire el agua aspirando suavemente la placa con el sistema de vacío. (Para utilizarlo correctamente, consulte las recomendaciones del fabricante.)
- Prepare brevemente (30 segundos) las microesferas LSA centrifugando el vial a 600 – 800 xg para desprender del tapón o de las paredes del vial todas las microesferas o restos de líquido. Agite bien en vórtex (-1 minuto) para resuspender de forma homogénea las microesferas.
- Añada 40 µL de microesferas LSA a cada uno de los pocillos asignados. Mientras distribuye las microesferas, agite en vórtex cada 2 minutos el vial de las microesferas LSA para mantenerlas en suspensión, y luego añada 10 µL del suero del paciente y del suero de control (Protocolo 1) o 20 µL del suero del paciente y del suero de control (Protocolo 2) y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas resuspendidas para asegurar que se distribuyan suficientes microesferas en los pocillos y tiempos reducidos de recuento. Si las microesferas no se agitan intermitentemente en vórtex, se depositarán en el fondo del tubo. Esto causará que se dispense una cantidad diferencial de microesferas en los pocillos, lo cual puede afectar negativamente a los tiempos de ensayo y el análisis de los resultados.

- Cubra la placa con la cubierta de plástico adhesivo y protéjala de la luz con papel de aluminio o en una caja. Incube la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C) en la oscuridad y sobre una plataforma rotatoria. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, los sueros control y las microesferas que no haya utilizado, para usos futuros. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a ≤ -65°C, las porciones que no haya utilizado de la mezcla de microesferas LSA, para usos futuros.
- Diluya el conjugado con tampón de lavado (5 µL de conjugado en 45 µL de tampón de lavado por muestra). Para compensar las pérdidas por pipeteo, es aconsejable preparar un (1) volumen extra de conjugado diluido. Cúbralo con papel de aluminio o consérvelo en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta que lo utilice. Vuelva a almacenar, en la oscuridad y a 2-8°C, el conjugado concentrado que no haya utilizado, para usos futuros.
- Tras los 30 minutos de incubación, retire la cubierta de plástico adhesivo y añada 100 µL de tampón de lavado a cada pocillo. Mezclar para volver a suspender las perlas y succionar ligeramente la placa.

PRECAUCIÓN: Si la intensidad de vacío es excesiva, las microesferas se adherirán a la membrana y puede causar que el análisis de la muestra fracase. Aplique la presión de vacío mínima necesaria para aspirar las muestras.

- Añadir 250 µL de Buffer de lavado a cada pozo, mezclar para volver a suspender las perlas, succionar y repetir dos veces más el procedimiento para realizar un total de tres lavados.

PRECAUCIÓN: Un lavado incompleto puede reducir la capacidad del conjugado de detectar IgG unida a microesferas sensibilizadas y conducir falsos negativos.

- Añada 50 µL de conjugado diluido a cada uno de los pocillos. Proteja la placa de la luz con papel de aluminio o en una caja. Colóquela en una plataforma rotatoria (a 200 rotaciones por minuto) o agítela suavemente en vórtex cada 5-10 minutos. Incúbela durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24°C).
- Con una punta de pipeta limpia, añada de 130 a 150 µL de tampón de lavado en cada pocillo y mezcle para resuspender las microesferas.
- Recolecte los datos con el aparato Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un retraso de más de 3 horas puede aumentar las probabilidades de obtener reacciones falsamente positivas o falsamente negativas. Vuelva a almacenar a 2-8°C el tampón de lavado que no haya utilizado, para usos futuros.

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

RESULTADOS

Introduzca los valores de Intensidad Mediana de Fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) cruda para cada microesfera en la hoja de registro específica del lote. Para determinar si una microesfera es positiva, primero determine si el valor de MFI de cada microesfera con antígeno unido es superior al umbral indicado en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit. Si el valor de MFI de una determinada microesfera con antígeno unido es superior al umbral, divida su MFI por el del antígeno de más baja clasificación (LRA, por sus siglas en inglés) del locus correspondiente, para obtener el cociente MFI/Antígeno de más baja clasificación (MFI/LRA). El LRA de cada locus es el valor de MFI de la microesfera con antígeno de más baja clasificación para ese locus.

Ejemplo : $\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "1"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "x" del locus "1"}$

$\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "2"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "y" del locus "2"}$

$\frac{\text{MFI de una microesfera individual}}{\text{MFI del LRA para el locus "3"}} = \text{MFI/LRA para el antígeno "z" del locus "3"}$

Consulte en la hoja de registro específica del lote que se suministra con el kit, la lista de antígenos presentes en cada microesfera, y el valor de corte para determinar el resultado positivo/negativo para cada microesfera con antígeno unido. Se considera que una microesfera con antígeno unido es positiva cuando el valor de MFI es superior al umbral de MFI y el cociente MFI/LRA es superior al valor de corte.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de LSA de clase I y clase II se desarrolla dentro del sistema de pruebas, incluyendo un suero control positivo y negativo. Estos sueros control deben incluirse con cada prueba que se realice para ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos de reactivos. Los sueros del control positivo reaccionarán con un número elevado de microesferas conjugadas con HLA dando lugar a un patrón similar al indicado en la hoja de registro específica del lote. Los sueros de control negativo reaccionarán con pocas o ninguna de las microesferas conjugadas con HLA dando lugar a valores de MFI cruda ≤ 1000 .

Los juegos de microesferas incluyen microesferas de control para verificar los resultados de cada muestra. La microesfera de control positivo está recubierta con IgG humana y debería indicar una MFI ≥ 10.000 con los sueros control. Si se obtienen valores de MFI inferiores a 10.000 con los sueros control, es probable que el lavado del ensayo haya sido insuficiente o que el conjugado no esté en buenas condiciones. Las muestras de pacientes muestran un amplio rango de reactividad con la microesfera de control positivo, pero siempre deberían generar una señal de MFI ≥ 10.000 . La microesfera de control negativo debería generar valores bajos de MFI con los sueros de control. Consulte en la hoja de registro específica del lote los límites observados para las microesferas de control con los sueros de control.

El ensayo se debe llevar a cabo según las recomendaciones del envase, así como según otros procedimientos de control de calidad que cumplen las especificaciones locales, estatales, federales y/o de las agencias certificadoras.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana de los materiales, incubaciones demasiado cortas, lavado o decantado insuficiente de las microesferas, exposición del conjugado a luz parásita u omisión de reactivos o etapas de la prueba.

La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobina en la muestra del paciente puede incrementar las uniones inespecíficas y producir resultados erróneos en este ensayo.

Los anticuerpos detectados por los kits LSA son aquellos reactivos dentro de la población de antígenos disponibles detallados en la hoja de registro.

Las glicoproteínas de un solo antígeno HLA, de clase I y II, de LIFECODES se obtuvieron de líneas de células que indicaban antígenos individuales HLA.

Algunos IgG con baja avidéz o título bajo, IgA, IgM y anticuerpos monoespecíficos contra antígenos no incluidos en el panel, no se detectarán con ensayos de un solo antígeno de LIFECODES.

Los títulos de anticuerpos del suero están específicamente relacionados al paciente y a momentos determinados. Si muchas microesferas están produciendo valores de MFI mayores de 15.000, puede ser necesario diluir los sueros para detectar mejor los anticuerpos IgG.

Debido a la complejidad del análisis de HLA, la interpretación de los datos debería ser revisada por personal cualificado. En la determinación de la especificidad de los anticuerpos con los kits LSA deben tenerse en cuenta los resultados de todas las microesferas, incluyendo aquellas iguales o similares al valor de corte. Puede ser útil el conocimiento del paciente y la comprensión de los grupos con reactividad cruzada para asignar la especificidad a un suero determinado.

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Escaso número de microesferas	La mezcla de microesferas no está correctamente suspendida	Agítela en vórtex por pulsos para resuspenderla por completo
	Fallo del aparato – Mal equilibrado	Consulte el manual del aparato
	Fallo del aparato – Bloqueo del flujo de muestra	Consulte el manual del aparato
	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un nuevo kit
	Presión de vacío demasiado elevada/microesferas adheridas a la membrana	Reduzca la intensidad del vacío; para las placas de filtro MultiScreen de Millipore se recomienda un vacío de 271- 406 mb (203-305 mm Hg)
Se sobrepasa el umbral para la microesfera de control negativo (NC) con los sueros de control	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
No se alcanza el umbral para la microesfera de control positivo (PC) con los sueros de control	Conjugado en mal estado (p.ej., fotoblanqueo)	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
No se alcanza el umbral para la microesfera de control positivo (PC) con la muestra del paciente	Conjugado en mal estado (p.ej., fotoblanqueo)	Utilice un nuevo kit
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados
	Muestra agregada incorrecta	Repita con la muestra control correcta
Resultado anómalo para el suero control positivo	Lavado deficiente	Repita los lavados y supervíselos
	Adición de muestra incorrecta	Repita con la muestra control correcta
	Lavado deficiente	Repita y controle los lavados para asegurar que las microesferas se resuspenden correctamente
Asignación positiva para los sueros de control negativo (> 2 microesferas conjugadas con HLA) o MFI >10.000	Contaminación de la mezcla de microesferas, el tampón de lavado, los sueros de control negativo o el conjugado concentrado con muestra positiva	Reduzca la intensidad del vacío
		Utilice un nuevo kit
Placa de filtro obstruida	Materia particulada en la muestra	Centrifugue la muestra durante aproximadamente 5 minutos a 8.000 – 12.000 xg

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Cuando se utiliza el kit LIFECODES LSA siguiendo el procedimiento descrito, el resultado revela la presencia o la ausencia de anticuerpos IgG HLA. Para el ensayo clínico se usaron los valores de corte estándar de LABScreen, de modo que se consideraron positivas las puntuaciones > 4.

LSA Clase I

El kit LIFECODES LSA Clase I mostró una copositividad del 93,7 % (93,4 %) para 151 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class I- Combi, Cat. n° LS1A04 (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

LSA Clase II

El kit LIFECODES LSA Clase II mostró una copositividad del 90,5 % (89,9 %) para 150 muestras con antígenos coincidentes cuando se compararon con los resultados obtenidos por el método LABScreen Single Antigen HLA Class II- Group 1, Cat. n° LS2A01 (límite inferior del intervalo de confianza del 95 % unilateral).

REFERENCIAS

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.

REPRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Straße 32 D-63303 Dreieich, Alemania
Teléfono: +49 (0) 6103 80560, Fax: +49 (0) 6103 8056199

Servicio técnico para Europa: +32/3 385 47 91

Publicación: 2017-03-27

La documentación del producto y las traducciones están disponibles en: WWW.IMMUCOR.COM

FOLLETO INFORMATIVO DEL PRODUCTO

Detección del C3d de LIFECODES®

Para utilizarse en diagnóstico in vitro

ÍNDICE

Definición de los símbolos.....	1	Recogida y preparación de muestras.....	3
Uso previsto.....	1	Instrucciones de uso.....	3
Resumen y explicación.....	1	Resultados.....	4
Principios del procedimiento.....	1	Control de calidad.....	4
Reactivos suministrados.....	2	Limitaciones del procedimiento.....	5
A. Identificación y condiciones de almacenamiento.....	2	Resolución de problemas.....	5
B. Advertencias o precauciones.....	2	Características específicas del rendimiento.....	5
C. Purificación o tratamiento para el uso..	2	Referencias	6
D. Indicaciones de inestabilidad.....	2	Fabricante y representante autorizado....	6
Materiales necesarios pero no suministrados.....	2		

DEFINICIÓN DE LOS SÍMBOLOS

(Etiquetas de los productos y documentos complementarios)

Código del lote		Número de catálogo		Fecha límite de uso		Intervalo de temperaturas (almacenamiento)	
Fabricante		Sensible a la luz (Mantenga alejado de la luz)		Temperatura (almacenamiento)		Cantidad suficiente para N pruebas	
Representante autorizado en la Comunidad Europea		Advertencia					

USO PREVISTO

El kit de detección del C3d LIFECODES® es un equipo de análisis cualitativo para detectar el complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos del suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Este producto se ha diseñado para detectar el complemento C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos. Este producto contiene el anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE, microesferas de control positivo y un complemento con sueros humanos y un tampón de lavado.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Una parte alícuota de los antígenos HLA vinculados a las microesferas se deja incubar con un pequeño volumen de muestra de suero de prueba. Después de esta incubación inicial, se agrega un reactivo de suero negativo como fuente de complemento para una incubación adicional. Las microesferas sensibilizadas se lavan posteriormente para quitar el anticuerpo no vinculado. Se agrega después un anticuerpo contra el C3d humano conjugado con ficoeritrina. Después de otra incubación, se lava la muestra de prueba, se diluye y se

analiza con el instrumento Luminex. La intensidad de la señal de cada microesfera de la muestra de prueba se compara con la intensidad de la señal de los sueros de control negativo con el fin de determinar si la muestra se considera positiva o negativa para el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

A. Identificación y condiciones de almacenamiento

Número del producto de detección del C3d: 265400

1. **C3dCJ** Conjugado del C3d (número de pieza: 265410; 1200 µL). Anticuerpo contra el C3d humano conjugado con PE en un tapón de almacenamiento de base fosfatada, listo para utilizarse, que contiene NaCl, Tween-20 y azida de sodio. SENSIBLE A LA LUZ. Mantenga alejado de la luz directa durante períodos prolongados. **Almacene a 2 - 8 °C en la oscuridad hasta 3 meses o a ≤-65 °C hasta la fecha de caducidad.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces a ≤-65 °C después de la descongelación inicial.
2. **C3dCS** Suero de complemento (número de pieza: 265415; 2 frascos de 360 µL). Suero de donante varón al que no se ha realizado transfusión. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 4 veces después de la descongelación inicial.
3. **C3dPCB** Microesfera de control positivo del C3d (número de pieza: 265405; 24 µL). El tapón de almacenamiento es de base fosfatada y contiene NaCl, Tween-20, azida de sodio y proteínas bovinas. SENSIBLE A LA LUZ. **Almacene a ≤-65 °C.** Se puede volver a congelar hasta 6 veces después de la descongelación inicial.
4. **LMWB** Tapón de lavado (número de pieza: 628221; 30 mL). Tampón fosfato que contiene NaCl, Tween-20, azida sódica y seroalbúmina bovina. **Consérvelo a 2-8°C** y equilibrelo con la temperatura ambiente (20 a 24°C) antes de usarlo.

B. Advertencias o precauciones

1. Para utilizarse en diagnóstico *in vitro*
2. El material de origen humano usado para producir este kit se ha sometido a pruebas y los resultados son negativos para anticuerpos del VIH, VHC y HBsAg según los métodos aprobados por la Dirección de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer la certeza absoluta de que no hay agentes infecciosos. Por tanto, **siga las «precauciones universales»** cuando trabaje con estos materiales.
3. Los reactivos contienen un 0,1 % de azida de sodio como agente conservante, que puede reaccionar con los elementos de fontanería de plomo y cobre para formar azidas metálicas explosivas. Utilice grandes cantidades de agua cuando deseche materiales por un fregadero.
4. La contaminación bacteriana de las muestras o la existencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina pueden causar un aumento de los vínculos no específicos y generar resultados erróneos.
5. Después de utilizarlos, deseche todos los materiales según las normativas locales.
6. Consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales para obtener información adicional.
7. En los sueros de complemento almacenados a 2 - 8 °C durante períodos largos se ha observado que la actividad del complemento se reduce.
8. Las microesferas y el conjugado son SENSIBLES A LA LUZ. La exposición a la luz que exijan las actividades rutinarias se limitará a un máximo de tres horas.

C. Purificación o tratamiento necesario para el uso

1. Véase "Recogida y preparación de muestras".
2. Todos los componentes están listos para su uso y no se requiere ninguna dilución.

D. Indicaciones de inestabilidad

1. No utilice componentes ni controles que estén turbidos o cuya fecha de caducidad haya vencido.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS necesarios pero NO SUMINISTRADOS

- Kits LIFECODES LSA clase I (número de pieza: 265100, LSA1) o LIFECODES LSA clase II (número de pieza: 265200, LSA2).
- Equipo necesario para realizar los análisis LIFECODES LSA clase I o clase II de (véase el folleto informativo correspondiente, LC1683CEES).

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DEL SUERO

Se debe recoger sangre sin anticoagulante, utilizando una técnica aséptica, y se debe someter a las pruebas mientras esté reciente o se debe almacenar apropiadamente con el fin de reducir al máximo la posibilidad de reacciones de falsos positivos o de falsos negativos debidas a un almacenamiento inadecuado o a la contaminación de la muestra. El suero debe almacenarse a 2 - 8 °C hasta un máximo de 48 horas. Si el suero ha de almacenarse durante más de 48 horas, debe congelarse a -20 °C o menos, o a -80 °C si se ha de conservar hasta 2 años. Los laboratorios individuales deben establecer y validar métodos para almacenar sueros durante más de 2 años. El suero debe separarse de los glóbulos rojos cuando se almacena o transporta. Evite congelar y descongelar de manera repetida las muestras de suero.

PRECAUCIÓN: No utilice sueros contaminados microbiológicamente, hemolizados o lipémicos, ya que estos pueden producir resultados incoherentes.

Antes de los análisis, se deben agitar brevemente en vórtice y centrifugar todas las muestras (30 segundos a $\approx 10\,000\times g$) para sedimentar cualquier material particulado que pueda estar presente.

INSTRUCCIONES DE USO

PRECAUCIONES:

- Se DEBE tener cuidado para evitar la contaminación del tapón de lavado y del reactivo contra el C3d humano. La contaminación accidental de estos reactivos con suero humano puede producir posteriormente un error en la prueba.
- Una muestra de sueros de control positivo y negativo se debe incluir con cada prueba con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo.
- El suero de complemento es un reactivo de suero negativo necesario para el análisis de detección del C3d como fuente estándar de complemento.
- Además, siga las precauciones generales descritas en el folleto informativo del producto LIFECODES LSA (LC1683CEES).

- Encienda el instrumento Luminex con el fin de permitir un calentamiento de 30 minutos.
- Retire la mezcla de microesferas LSA, la microesfera de control positivo del C3d (C3dPCB), el suero de complemento del C3d (C3dCS) y el conjugado del C3d (C3dCJ) del congelador de -65 °C y almacene en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que se descongelen. Después de descongelar, coloque inmediatamente en hielo y proteja de la luz.
- Permita que el tapón de lavado alcance la temperatura ambiente (20 a 24 °C) antes de utilizarse. En este período, utilice la hoja de formato de la placa (LC979) para asignar una posición en placa para cada suero y para los controles que se analizarán. **Los sueros de control negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2) se usan como control negativo.**
- Cubra los pocillos no asignados de la placa de filtros con una cubierta plástica adhesiva. Humedezca previamente los pocillos que se utilizarán con 100-300 μL de agua destilada. Después de 2-5 minutos, quite el agua mediante una aspiración delicada utilizando un colector de vacío. (Véanse las recomendaciones del fabricante para conocer el uso adecuado.)
- Prepare las microesferas LSA centrifugando el frasco brevemente (30 segundos) a $\approx 600 - 800 \times g$ con el fin de retirar cualquier microesfera o líquido de la tapa o paredes del frasco. Agite en vórtice por completo (≈ 1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme. En otro frasco combine 1 μL /muestra de C3dPCB con el volumen apropiado de microesferas LSA (40 μL /muestra). Agite en vórtice por completo (≈ 1 minuto) con el fin de suspender nuevamente las microesferas de forma uniforme.
- Agregue 40 μL de la mezcla de microesferas LSA con C3dPCB a cada pocillo asignado. Agite en vórtice el frasco de microesferas LSA cada 2 minutos para mantener las microesferas en suspensión a la vez que estas se distribuyen. Centrifugue el suero (30 segundos a $\approx 10,000 \times g$) y agregue 10 μL de suero o suero de control y mezcle.

PRECAUCIÓN: Es importante mantener las microesferas nuevamente suspendidas para garantizar que se distribuyen suficientes microesferas en los pocillos y lograr unos periodos reducidos de recuento de microesferas. Si no se agitan en vórtice las microesferas de manera intermitente, esto hará que las microesferas se asienten en la parte inferior del tubo. De esta manera, se dispensarían las microesferas en cantidades diferenciales en pocillos, lo que podría afectar de manera adversa a los tiempos de ejecución y al análisis de los resultados.

- Cubra la placa con una cubierta plástica adhesiva y a continuación coloque láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) en la oscuridad en una plataforma giratoria (200 rotaciones por minuto). Vuelva a colocar las partes no usadas de los sueros de control en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8 °C para uso futuro. Vuelva a colocar las partes no usadas de la mezcla de microesferas LSA y C3dPCB en el lugar de almacenamiento a una temperatura de ≤ -65 °C en la oscuridad para uso futuro.
- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 30 μL de C3dCS a cada pocillo incluyendo el de control negativo. Vuelva a colocar el C3dCS en el lugar de almacenamiento a ≤ -65 °C inmediatamente después del uso. Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una



plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5-10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 – 24 °C).

- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.

PRECAUCIÓN: Si se usa una fuerza de aspiración excesiva, esto hará que las microesferas se adhieran a la membrana y producirá un fallo de la muestra. Aplique la presión mínima de vacío necesaria para aspirar las muestras.

- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo, aspire y repita tres veces más.

PRECAUCIÓN: Si no se lava por completo, se puede reducir la capacidad del conjugado de detectar el C3d vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos y los resultados producidos pueden ser falsos negativos.

- Centrifugue el C3dCJ durante 30 segundos en una microcentrifugadora (≈600 – 800 x g). El C3dCJ está listo para su uso y no se necesita ninguna dilución. Agregue 50 µL de C3dCJ a cada pocillo. Almacene el C3dCJ restante a 4 °C durante un máximo de tres meses o almacénelo a ≤-65°C hasta la fecha de caducidad.
- Cubra la placa con láminas de aluminio o una caja encima con el fin de proteger de la luz. Coloque en una plataforma giratoria (escoja la opción de 200 rotaciones por minuto) o agite en vórtice suavemente cada 5 - 10 minutos. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 24°C).
- Después de la incubación de 30 minutos, retire la cubierta plástica adhesiva y agregue 100 µL del tapón de lavado a cada pocillo. Mezcle golpeando ligeramente el lado de la placa y aspire suavemente la placa.
- Agregue 250 µL de tapón de lavado en cada pocillo y aspire.
- Utilice una punta de pipeta limpia, agregue 200 µL de tapón de lavado en cada pocillo y mezcle para volver a suspender las microesferas.
- Recabe los datos con el instrumento Luminex siguiendo las recomendaciones del fabricante y **utilice una plantilla de C3d de Luminex (consulte la documentación de LIFECODES LSA para conocer información específica del lote)**. Los retrasos mayores a 3 horas a temperatura ambiente pueden aumentar la posibilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos. Vuelva a colocar las partes no usadas del tapón de lavado en el lugar de almacenamiento a una temperatura de 2 - 8°C para uso futuro.

RESULTADOS

Detección del C3d: Para analizar los resultados de un lote de muestras:

- Cree una hoja de cálculo en Excel abriendo una copia del archivo de resultados en formato CSV con los resultados del lote de Luminex y "Guarde como" archivo de Excel. Se utilizará este archivo para los cálculos necesarios para analizar los resultados.
- Copie, de la hoja de cálculo de registro específica para el lote incluida en el kit LSA, el nombre del antígeno que corresponde a cada microesfera.
- Después, reste los valores la MFI del suero de control negativo (MFI del suero de control negativo) de la MFI no procesada para cada microesfera individual con el fin de calcular la MFI ajustada al contexto.

(a) **MFI ajustada al contexto = MFI de una muestra – MFI del suero de control negativo**

- A continuación, divida la MFI ajustada al contexto entre la MFI del control calculada (CalcCON) de su lugar respectivo para generar la proporción corregida para el contexto (BCR-Neg). El CalcCON de cada lugar es el valor de la MFI no procesada de la microesfera con el antígeno de menor categoría de ese lugar.

(b) **BCR-Neg = $\frac{\text{MFI ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El menor valor de MFI no procesada del lugar}}$**

- Por último, divida la MFI ajustada al contexto del antígeno entre el valor correspondiente de la MFI del antígeno para el suero de control negativo LSA (NC) con el fin de generar la fuerza relativa (fuerza R).

(c) **Fuerza R = $\frac{\text{MFI ajustada al contexto del antígeno}}{\text{El valor de la MFI no procesada del antígeno}}$**

Se considera positiva una microesfera si dos o más de los valores ajustados están por encima de los valores límite. Consulte el certificado de análisis del producto de detección del C3d (265400) para conocer los límites predeterminados positivos y negativos. Al ajustar estos límites se pueden obtener sensibilidades mayores o menores.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad de la detección del C3d está incorporado en el sistema de pruebas gracias a la inclusión de la microesfera de control positivo y del suero de control positivo y negativo (suministrados en los kits LSA1 y LSA2). Estos controles deben incluirse en cada



análisis con el fin de ayudar a determinar si han ocurrido errores técnicos o fallos del reactivo. El suero de control positivo reaccionará con una serie de microesferas conjugadas LSA para generar un patrón similar al del gráfico de detección del C3d. El suero de control negativo reaccionará con solo unas pocas microesferas conjugadas LSA, e incluso podría no reaccionar. La microesfera de control positivo del C3d debería generar valores de la MFI $\geq 10\,000$, con un análisis en que se utilice el suero de control negativo. Los valores de muestras menores que 10 000 pueden indicar que no se ha agregado suficiente cantidad de C3dCJ, que se ha lavado deficientemente el material de análisis o que la calidad de C3dCJ se ha visto afectada. El recuento de microesferas debería ser de por lo menos 40 reacciones.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden darse resultados erróneos por la contaminación bacteriana de los materiales de pruebas, periodos inadecuados de incubación, el lavado inapropiado o la decantación de microesferas, la exposición de C3dCJ a luz dispersa o la omisión de reactivos o pasos en los análisis.

La presencia de complejos inmunes u otros agregados de inmunoglobulina en la muestra de sueros puede producir un aumento de vínculos no específicos y generar resultados erróneos de este análisis.

Los valores de los anticuerpos de los sueros son específicos de periodos y muestras. Si muchas microesferas producen valores de la MFI mayores que 15 000, podría ser necesario diluir los sueros.

Debido a la naturaleza compleja de las pruebas de los HLA y a los diversos factores que podrían afectar la cascada de complementos que conduce a la formación del C3d, los resultados se deben revisar e interpretar por parte de personas capacitadas. El uso de cualquier suero de control y de valores límite diferentes a aquellos suministrados en el certificado de análisis no ha sido validado.

Esta prueba no puede usarse como la única base para las decisiones clínicas.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

(Consulte también el folleto informativo de los productos LSA clase I y clase II de LIFECODES, LC1683CEES).

PROBLEMA	CAUSA POSIBLE	SOLUCIÓN
Bajo recuento de microesferas, solo para C3dPCB	No se agregaron suficientes microesferas a la mezcla de microesferas LSA	Vuelva a suspender completamente generando un vórtice breve, evite las pipetas de $<3\,\mu\text{L}$. Utilice pipetas calibradas.
	Fallos del instrumento - no se calibra correctamente	Vea el manual de Luminex
Valores de la MFI de control positivo del C3d con suero $<10\,000$	Microesferas fotoblanqueadas	Utilice un frasco nuevo de C3dPCB
	Se agregó C3dCJ fotoblanqueado o insuficiente a la reacción	Repita el análisis. Utilice un frasco nuevo de C3dCJ
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
Baja MFI para el suero de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	No se agregó suficiente C3dCJ a la reacción.	Repita el análisis con la cantidad correcta de C3dCJ.
	No se agregó suficiente C3dCS o no se agregó ningún C3dCS a la reacción.	Repita el análisis agregando C3dCS.
	Baja temperatura de análisis	Confirme que el análisis se realiza a 20°C - 24°C . Intente realizarlo en el límite superior de temperatura para lograr una MFI mayor.
Patrón anómalo para los sueros de control positivo	Se agregó la muestra incorrecta.	Repita el análisis con la muestra de control correcta.
	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados.
MFI alta para los sueros de control negativo (>1500)	Lavado deficiente	Repita el análisis y vigile los lavados para garantizar que las microesferas se vuelven a suspender durante el lavado.
		Disminuya la potencia de aspiración.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

Cuando se utiliza el equipo de detección del C3d de LIFECODES según el procedimiento descrito anteriormente, los resultados revelan la presencia o ausencia del complemento vinculado al complejo de anticuerpos y antígenos.

Se realizó un estudio utilizando 142 muestras que comparaba la detección de C3d de LIFECODES y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC por sus siglas en inglés). Para este juego de muestras, la sensibilidad de la detección del C3d de LIFECODES era

mejor que la de la prueba de CDC para la detección del complemento de vínculo del anticuerpo HLA en muestras de suero positivo, según se desprende de los análisis LSA de las clases I y II de LIFECODES.



REFERENCIAS

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. y Clavien P.A. What's Hot, What's New at WTC—Clinical Science. *Am J Transplant*, 2015; 15(2): 327-332.
4. Lan, J. et al. Clinical Relevance of C3d-Binding Donor-Specific Antibodies in Late Kidney Allograft Failure. *Am J Transplant*, 2015; 15(S3).
5. Lan, J. et al. Complement-Fixing Donor-Specific HLA Antibodies Detected By Novel C3d Assay Are Associated With Antibody Mediated Rejection in Heart Transplant Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2015; 34(4): S130.
6. Toutirais, O. et al. Clinical outcome of heart transplant recipients with complement binding donor specific antibodies. *Tissue Antigens*, 2015; 85(5): 431.
7. Dubois, V. et al. Pregnancy and Donor-Specific HLA-antibody-mediated humoral rejection in young women after liver transplantation: "Liaisons Dangereuses"? *Tissue Antigens*, 2015; 85(5): 306.
8. Wahrmann, M. et al. Modified solid-phase alloantibody detection for improved crossmatch prediction. *Human Immunol*, 2013; 74(1): 32-40.
9. Sacks, S.H. and Zhou, W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nature Rev Immunol*, 2012; 12(6): 431-442.
10. Gieriej, 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. Rodríguez, 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.

PRESENTANTE AUTORIZADO

Representante autorizado: Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Strasse 32, 63303 Dreieich, Germany

Servicio Técnico Europeo: +32/3 385 47 91

Emitido: 2017-02-23



HEMOMEDICA
PAULA
Directora
12.03.2017

HEMOMEDICA S.R.L.
Socio Gerente

IF-2023-24588443-APN-INBM#ANMAT

LC1495CEES Rev. B



(01)10888234400349



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES LSATM CLASS II

Box 1 of 2

LSA2

REF 265200

LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD



LSAPC2	265201	Box 1
LSANC2	265202	
LMWB	628221	
LSACJ	265010	
LSA2B	265203	Box 2

EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



IVD



KEEP AWAY
FROM LIGHT



265200LB Rev. A

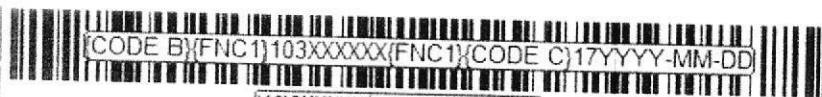
ROTULO ORIGINAL

HEMOMEDICA
PAULA
Directora
Nº 12 85...

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



(01)10888234400332



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES LSA^{TV} CLASS I

Box 1 of 2

LSA1

REF 265100

LOT 3XXXXXX

YYYY-MM-DD

LSAPC1 265101

Box 1

LSANC1 265102

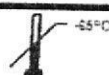
LMWB 628221

LSACJ 265002

LSA1B 265103

Box 2

EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



IVD



KEEP AWAY
FROM LIGHT



265100LB Rev. A

ROTULO ORIGINAL

HEMOMELI
PALEA
Directorio
N. 12 63

IF-2023-24588443-APN: INPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



(01)10888234400486



(10)3XXXXXX(17)YYYY-MM-DD

LIFECODES C3d DETECTION Box 1 of 2

C3d

REF 265400

LOT 3XXXXXX



YYYY-MM-DD

	C3dPCB	265405	Box 1: 265420-24
2X	C3dCS	265415	-65°C
	C3dCJ	265410	

Box 2: 628221 **LMWB** Shipped Separately

EC REP Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Robert-Bosch-Strasse 32
63303 Dreieich
Germany



265400LB Rev. A

KEEP AWAY FROM LIGHT



ROTULO ORIGINAL

HEMONEU
PAULA
Directora
N. 12 B50

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente

SOBREROTULO

HemoMedica

Importado por:

Hemomedica S.R.L.

California 2082, Piso 2, Of 217, CABA

Argentina

"Autorizado por ANMAT PM 1049-64"

DT: Ana Paula Zucchini. M.N. 12855

HEMOMEDICA S.R.L.
PAULA ZUCCHINI
Directora
M.N. 12 855

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT
HEMOMEDICA S.R.L.
GUSTAVO A. REINOSO
Socio Gerente



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Las Malvinas son argentinas

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: ROTULOS Y MANUALES DE USO

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 48 pagina/s.

IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2023-24588443-APN-INPM#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Martes 7 de Marzo de 2023

Referencia: LIFECODES rótulos e instrucciones de uso

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 49 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2023.03.07 07:50:40 -03:00

Marcela Claudia Rizzo
Directora Nacional
Instituto Nacional de Productos Médicos
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología
Médica

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2023.03.07 07:50:44 -03:00