



今日から始めるHLA Vol.2 HLA抗体検査

第2部 HLA Fusionでの解析・検体の前処理

株式会社ベリタス

2023年10月11日



VERITAS

Veritas Corporation

HLA Fusionへ測定結果のインポート

解析に必要なファイル

• 血清型ファイル

- 最新の血清型、アレル情報を含む
- 年に2回更新(1月と7月のIMGT更新にあわせて更新される)
- ファイル名の例 : sero_equivalent_2023January.csv

常に同じ

IMGTのバージョン

• カタログファイル

- 各製品で検出ができるアレル情報を含む
- 製品&ロットごとに作成
- ファイル名の例 : LS1A04NC26_014_00.cat

製品コード

製品ロット

NC血清のロット

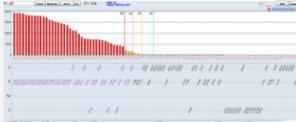
バージョン

ファイルのダウンロード

- https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html

カタログファイル

カタログファイル、テンプレートファイルは下記ページよりダウンロードできます。

HLA Fusion カタログファイル  HLA Fusion™ カタログファイル クリック	LABScanシステム テンプレートファイル  LABScanシステム用 テンプレートファイル クリック	LABScan3D テンプレートファイル  LABScan3D用 テンプレートファイル クリック
--	--	---

カタログファイルのリンク先

カタログファイルのインポート方法は下記のリンクをご覧ください。

- [カタログファイルのインポートマニュアル](#) 

HLA Fusionの解析に使用するカタログファイルは、当サイトからダウンロードできます。

当サイトに掲載していない製品・ロットのカタログファイルは、One Lambdaのウェブサイトからダウンロードするか、弊社にお問い合わせください。

※One Lambdaのウェブサイトからファイルのダウンロードには、アカウント登録が必須となります。
アカウント登録方法とファイルの入手方法は下記のリンクをご覧ください。

- [One Lambda アカウントの登録方法](#) 
- [One Lambda 各種ファイルのダウンロード方法](#) 

HLA Fusion 血清型ファイル(Nomenclature)

One LambdaよりリリースされているIMGT/HLAの血清型ファイルです。LABScreen、LABType、マイクロSSPが対象です。

[血清型ファイル](#) (IMGT 3.51/2023 January版 **2023/6/28 更新**)

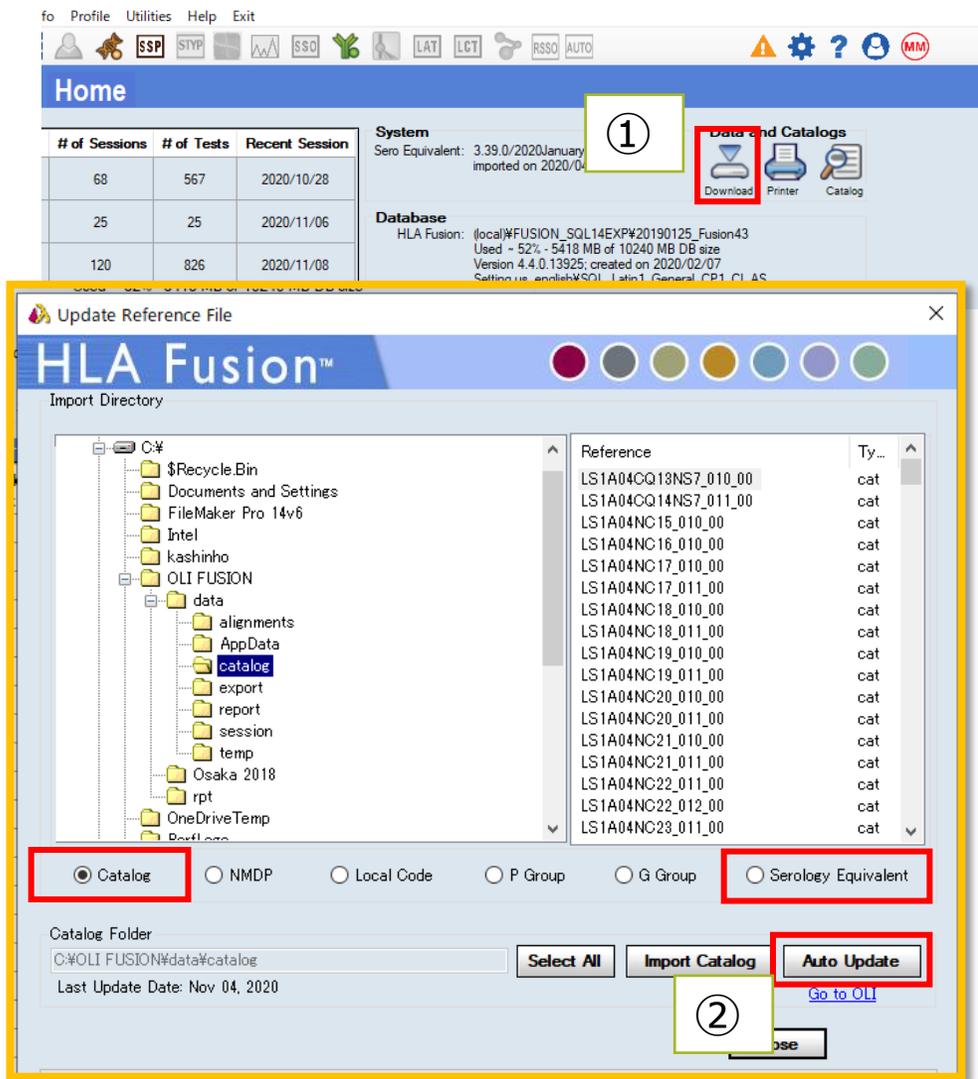
[HLA Fusion™ へのインストール方法](#)

血清型ファイル

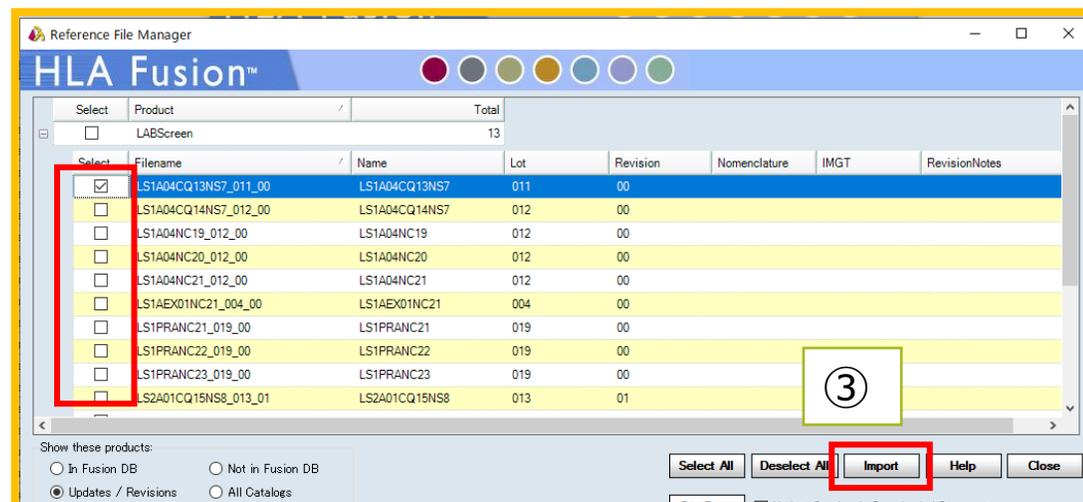
LABScreen カタログファイル

[LABScreen Single Antigen Class I](#)
[LABScreen Single Antigen ExPlex Class I](#)
[LABScreen Single Antigen Supplement Class I](#)
[LABScreen Single Antigen Class II](#)

解析ファイルの自動インポート

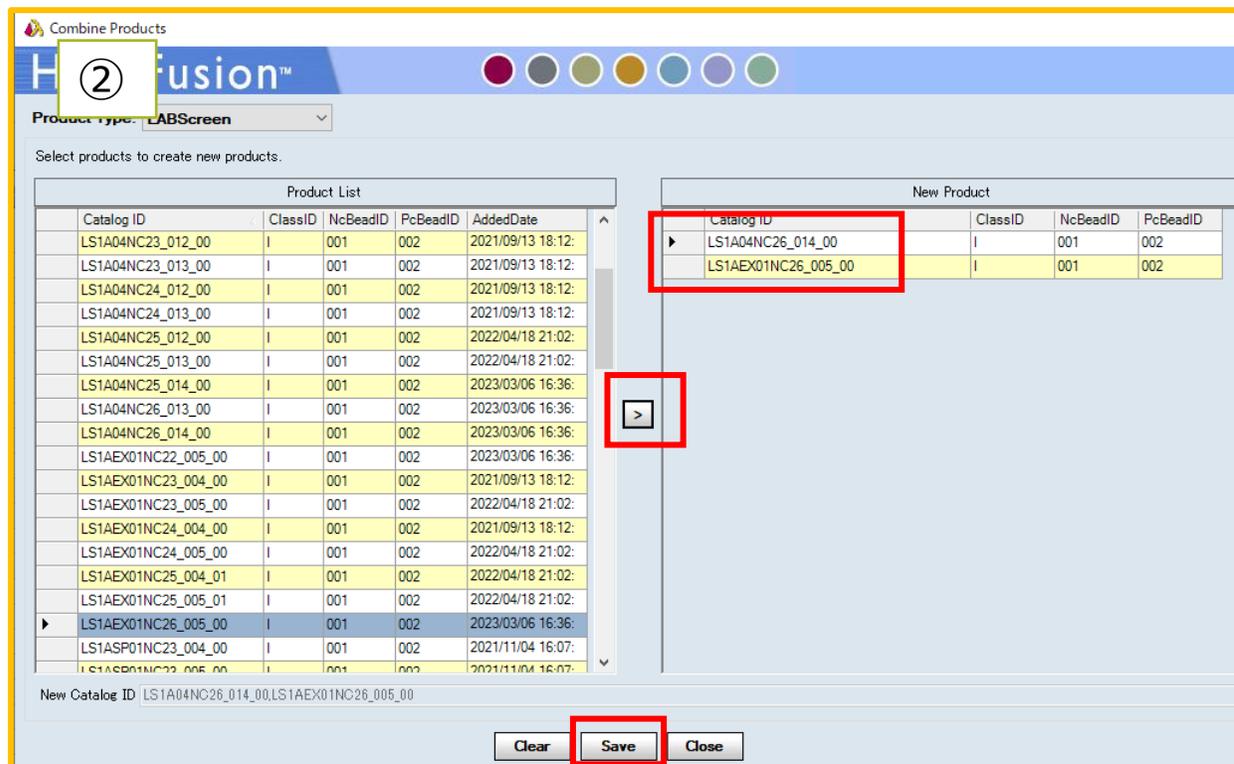
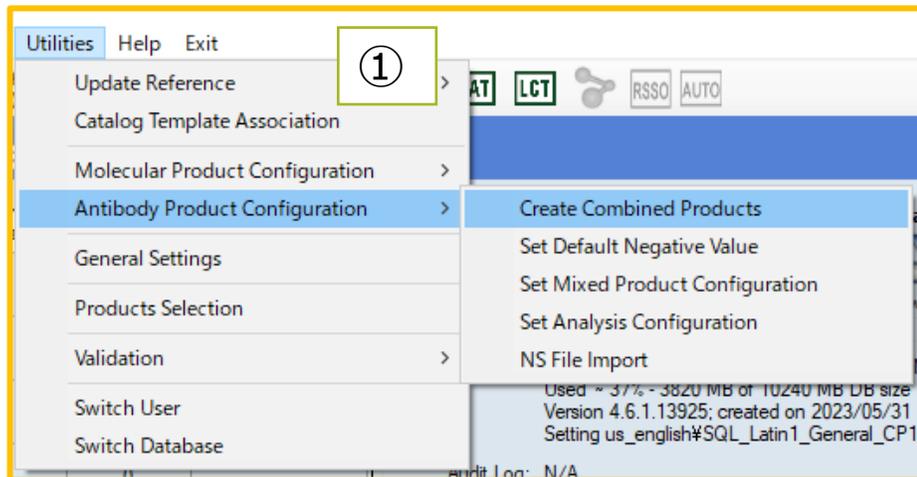


インターネットにつながっているPCのみ使用可能

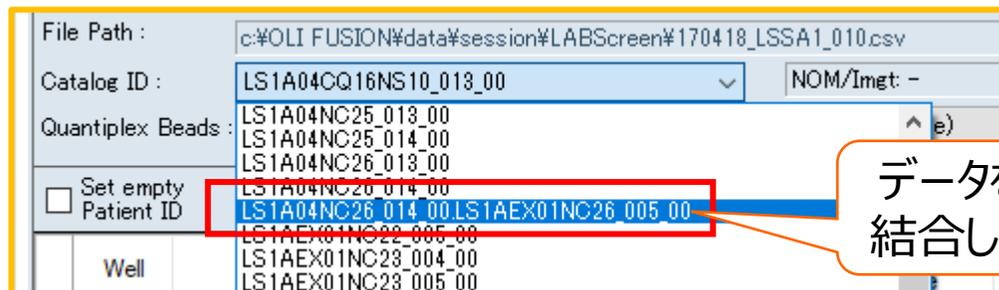


カタログファイルの場合：インポートするファイルにチェックを入れる

カタログファイルの結合



- データをインポートする前に、2つのカタログファイルをひとつのファイルに結合する
 - ExPlex試薬使用時
 - PRAをクラス1とクラス2を同時測定時



データをインポートする際に結合したファイルを選択する

インポートの手順

① 20190515QCWS_SA2013_NC020_20190515_123530

②

③

④

⑤

Check Control Import Delete Patient Close

Well	Sample	Sample Date	Sample Treatment	Sample Source	Dilution Factor	Secondary Ab	Luminex Min Bead Cnt	NS	Exist In DB	Patient ID	First Name	Last Name	Ethnicity	Patient/Donor
78(1.A1)_NC							100	<input checked="" type="checkbox"/>	N					
74(1.B1)_SH8101							100	<input type="checkbox"/>	N					
76(1.C1)_SH8102							100	<input type="checkbox"/>	N					
76(1.D1)_SH8103							100	<input type="checkbox"/>	N					
77(1.E1)_SH8104							100	<input type="checkbox"/>	N					
78(1.F1)_SH8105							100	<input type="checkbox"/>	N					
79(1.G1)_SH8106							100	<input type="checkbox"/>	N					

LABScreen Check NS

Selected NS: NC Catalog: LS2A01NC20_013_01

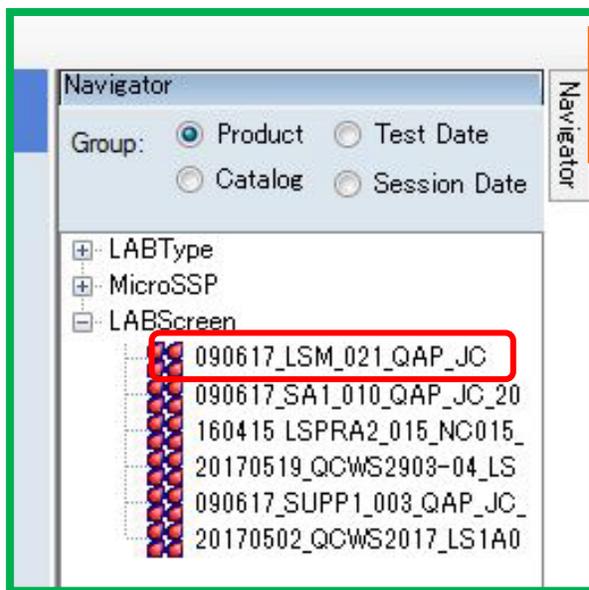
Default NS: OLINS:LS2A01NC20_013_01

メーカーQC

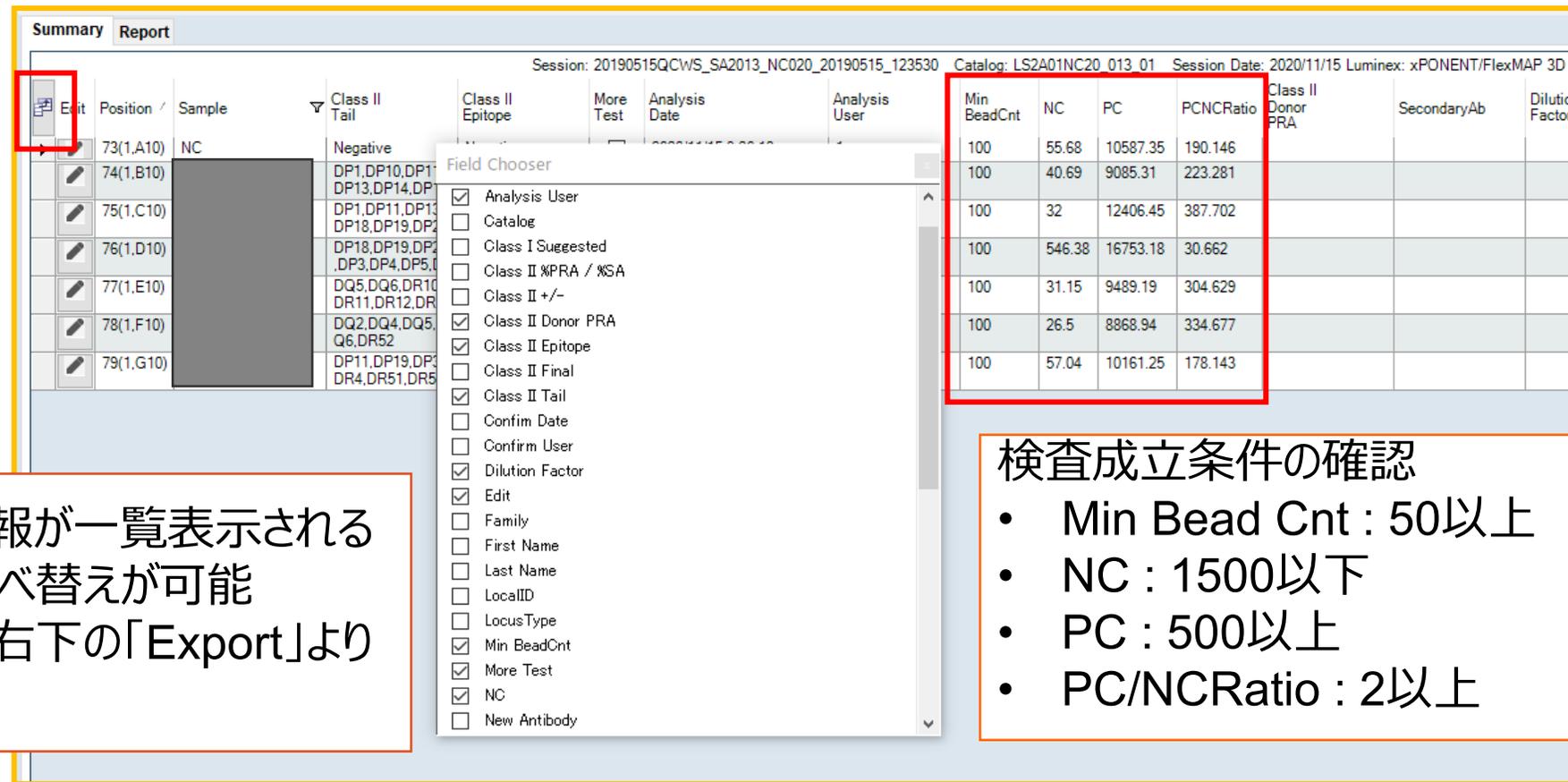
測定データ

① インポートするcsvファイルを選択
② カタログファイル選択
③ NC血清を選択
④ NC血清の値を確認
⑤ データのインポート

Summary画面



インポート後、Navigatorからデータを選ぶと、検体一覧の画面が開く



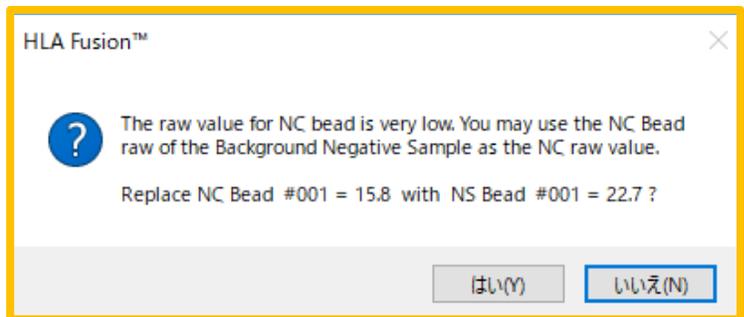
Min BeadCnt	NC	PC	PCNCRatio	Class II Donor PRA	SecondaryAb	Dilution Factor
100	55.68	10587.35	190.146			
100	40.69	9085.31	223.281			
100	32	12406.45	387.702			
100	546.38	16753.18	30.662			
100	31.15	9489.19	304.629			
100	26.5	8868.94	334.677			
100	57.04	10161.25	178.143			

- Summaryで各検体の情報が一覧表示される
- 表示する項目は変更、並べ替えが可能
- Summary画面の情報は右下の「Export」よりエクセルで出力できる

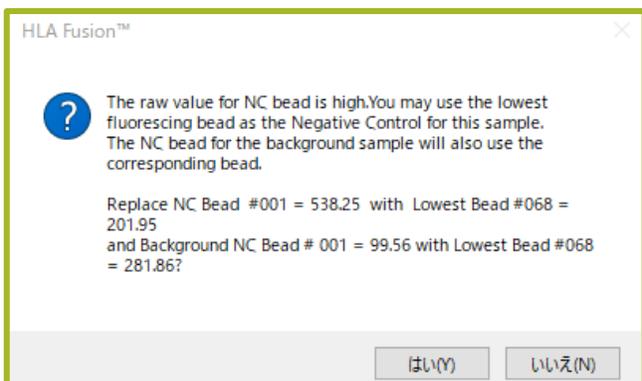
検査成立条件の確認

- Min Bead Cnt : 50以上
- NC : 1500以下
- PC : 500以上
- PC/NCRatio : 2以上

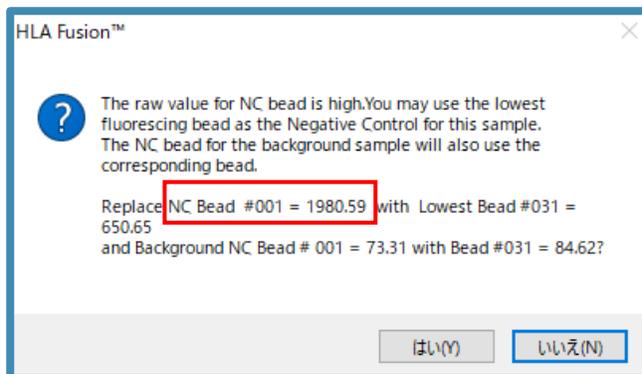
データインポート時のメッセージ



* 検体のNCビーズが、NC血清のNCビーズより低い時に表示されます
検体のNCビーズの値をNC血清のNCビーズの値と書き換えますか？
→「いいえ」を選択



* 検体のNCビーズが検体の他のビーズより高い時に表示されます
検体のNCビーズの値が高いので、検体の一番低いビーズの値と書き換えますか？
それに伴って、NC血清のNCビーズも変更しますか？
→「いいえ」を選択



検体のNCビーズ値が1500を超えている場合は
再検査をしてください



VERITAS

Veritas Corporation

LABScreen Mixedの解析

解析画面

Class I

Class II

陽性カットオフライン

陰性カットオフライン

陽性と陰性カットオフの間にあるビーズはグレー表示

**陽性及び陰性のカットオフラインは手動で上下に動かすことができます
判定結果はソフトが自動判定した結果が反映されますが、手動で変更できます**

コントロール値

判定結果の確認

全ビーズの測定値の確認

解析結果の保存

Statistics

PC: (002) 9094.41
 NC: (001) 609.91
 PC/NC: 14.91

NC Inrshold (CL1): 50(50)
 NC Threshold (CL2): 50(50)

Class I Computer Assignment Positive
 Final Assignment Positive Negative Undetermined

Class II Computer Assignment Positive
 Final Assignment Positive Negative Undetermined

MIC Computer Assignment Negative

Comments/ (System): NC Raw >=500.NC Raw >=500Adjusted Cutoff.

More Test Raw Data Save>> Confirm>>

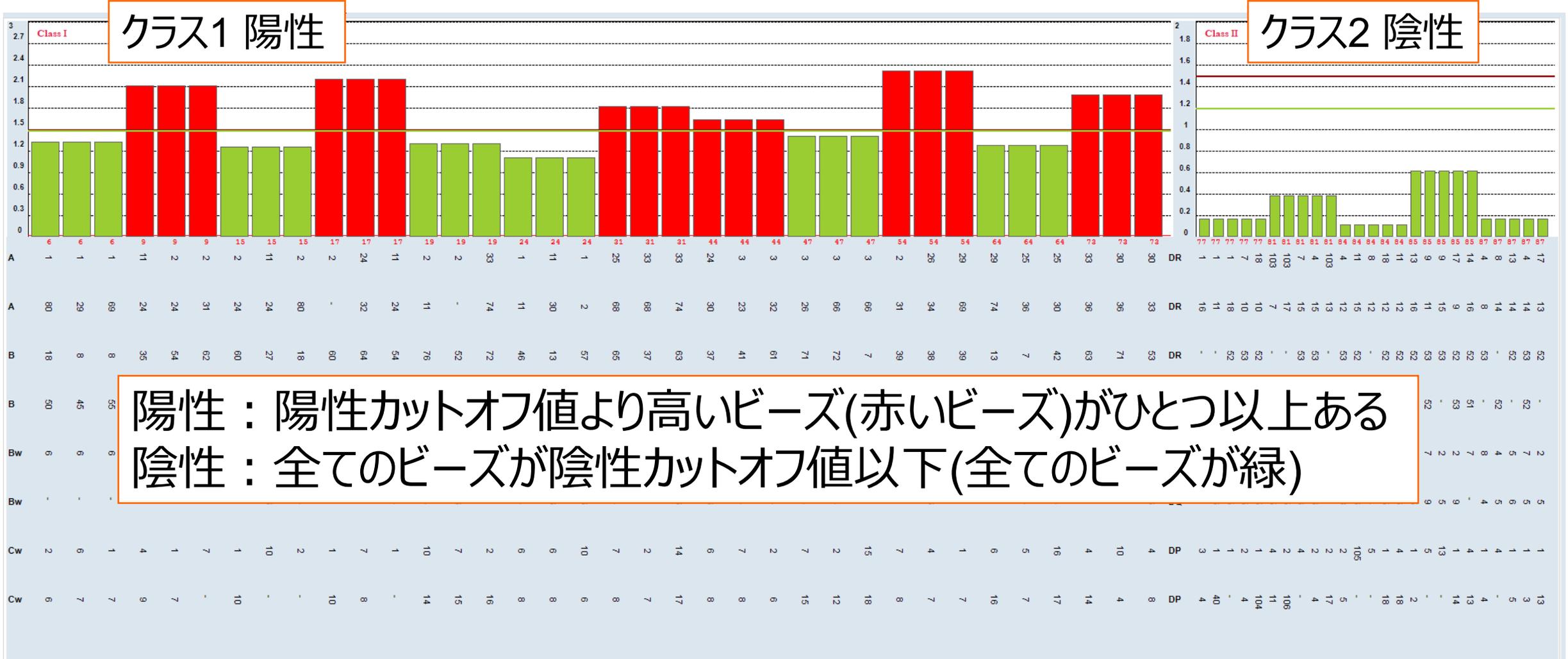
NBG Ratio

- NBG Ratio = Normalized Background Ratio
- 算出方法
(検体の各ビーズ値-検体のNCビーズ値)
/(NC血清の各ビーズ値-NC血清のNCビーズ値)
✓分母が50未満の場合は分母は50として計算される

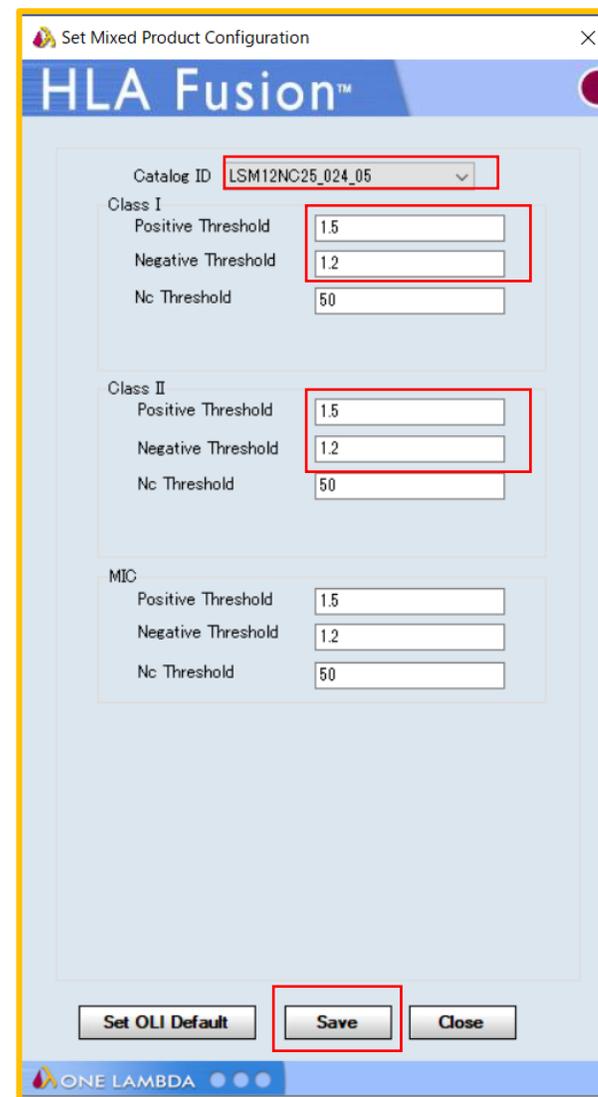
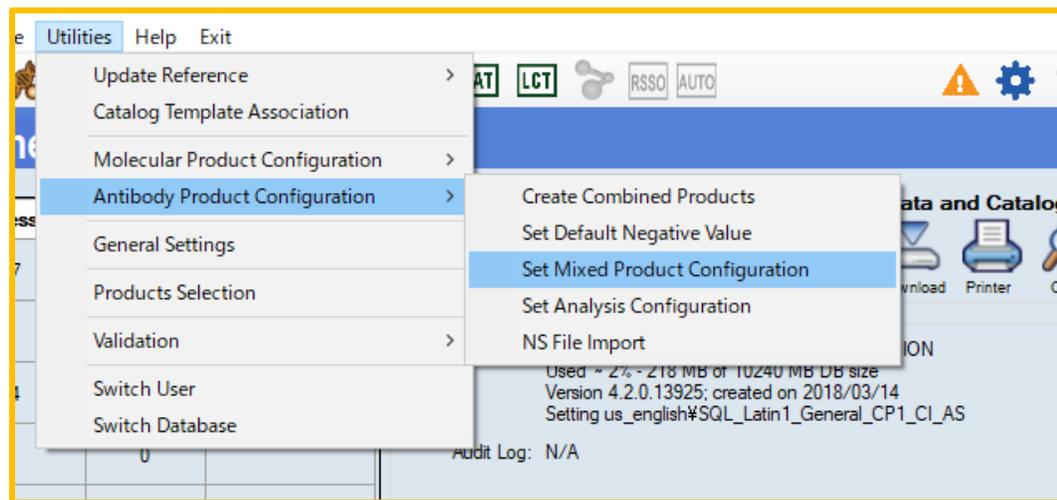
Bead ID	Class	Sample Raw	Sample NC	LSNS Raw	LSNS NC	NBG Ratio	Baseline	Rxn	Count	S1
001	NC	609.91	609.91	40.67	40.67	0			187	
002	PC	9094.41	609.91	9873.95	40.67	0.8628			160	
003	I	5545.42	609.91	166.77	40.67	39.1396	809.41	1	151	A1
003	I	5545.42	609.91	166.77	40.67	39.1396	809.41	1	151	A1
003	I	5545.42	609.91	166.77	40.67	39.1396	809.41	1	151	A1
004	I	15660.4	609.91	144.37	40.67	145.1349	4946.79	8	104	A2
004	I	15660.4	609.91	144.37	40.67	145.1349	4946.79	8	104	A2
004	I	15660.4	609.91	144.37	40.67	145.1349	4946.79	8	104	A1
005	I	14819.17	609.91	192.34	40.67	93.6854	4057.59	8	124	A2
005	I	14819.17	609.91	192.34	40.67	93.6854	4057.59	8	124	A1
005	I	14819.17	609.91	192.34	40.67	93.6854	4057.59	8	124	A2
007	I	16885.34	609.91	135.66	40.67	171.3383	6180.44	8	108	A2
007	I	16885.34	609.91	135.66	40.67	171.3383	6180.44	8	108	A2
007	I	16885.34	609.91	135.66	40.67	171.3383	6180.44	8	108	A1
009	I	16417.99	609.91	164.23	40.67	127.9385	5684.52	8	115	A2
009	I	16417.99	609.91	164.23	40.67	127.9385	5684.52	8	115	A2

各検体の解析画面の右下の「Raw Data」をクリックすると表示される

結果判定



カットオフ値の変更



1. Catalog IDよりカタログを選択
 2. NBG Ratio値を変更
 3. 「save」をクリック
- * カタログごとに変更が必要 *

レポート-1

Analyze Data **Reports** Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Home, Print, Search, etc. icons

Patient Generic Typing LABType MicroSSP Generic Antibody LABScreen Specialty Statis

Sample Summary LSM Details LSM Summary LSM Overview Product Compare

Patient or Donor ID: * Session: * Batch: * Sample ID: *

SessionID WellPosition SampleID PatientID

LSM Detail

Approved By: _____ Date: _____

Session ID: 200907_LSM022_NC023_20200907_124154
Catalog: LSM12NC23_022_00

NS Sample: NC

Background Value	005	007	132.31	008	129.79	013	114.74	018	128.56	030	129.09	041	123.49	043	133.09	053	133.52	059	126.96
061	128.84	062	143.13	078	92	081	109.28	083	107.59	084	66.02	096	95.5	099	90.6	100	90.09	NC	114.76
PC	1212247																		

Class I Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 Class I Sensitivity/MFI: 0
Class II Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 Class II Sensitivity/MFI: 0
MIC Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 HNA Sensitivity/MFI: 0

Patient ID: _____ Patient Name: _____ Local ID: _____

Patient ID:	Status	Transplant Type						Class II						Sample Date									
		Class I			Class II			Class II			Class II												
Overall Positive	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count	Overall Positive	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count	Overall Positive	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count	Overall Positive	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count
	005	Positive	831.5	16.21	112		078	Undetermined	95.78	1.49	157		081	Positive	232.02	4.22	163		083	Negative	68.14	0.94	155
	007	Positive	977.6	19.13	192		084	Positive	137.78	2.33	152		096	Negative	75.5	1.09	151						
	008	Positive	622.27	12.02	147																		
	013	Positive	849.77	16.57	101																		
	018	Positive	951.22	18.60	100																		
	030	Positive	775.82	15.09	148																		
	041	Positive	703.83	13.65	169																		
	043	Positive	885.08	17.28	162																		
	053	Positive	706.84	13.71	197																		
	059	Positive	698.43	13.55	142																		
	061	Positive	650.73	12.59	159																		
	062	Positive	942.17	18.42	184																		

MIC

Overall Negative	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count
	099	Negative	24.83	0.07	147
	100	Negative	22.72	0.03	170

Sec. Ab: _____ Treatment: _____
Saved By: 1,1 Saved Date: 11/22/2020
Confirmed By: _____ Confirmed Date: _____
Comment: _____
User Comment: _____

11/22/2020 HLA Fusion™ 4.4.0.13925 Page 1 of 1

全てのビーズのNBG Ratioやビーズカウントが表示される

レポート-2

Analyze Data **Reports** Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Patient Generic Typing LABType MicroSSP Generic Antibody LABScreen Specialty Statistics

Sample Summary

- LSM Details
- LSM Summary**
- LSM Overview
- Product Compare

SessionID
WellPosition
SampleID
CatalogID

LSM Summary

Approved By: _____ Date: _____

Session ID: 200907_LSM022_NC023_20200907_124154
Catalog ID: LSM12NC23_022_00

NS Sample: NC

Background Values

005	121.21	007	132.31	008	129.79	013	114.74	018	128.56	030	129.09	041	123.49	043	133.09	053	133.52	059	126.96
061	128.84	062	143.13	078	92	081	109.28	083	107.59	084	66.02	096	95.5	099	90.6	100	90.09	NC	114.76

PC 1212247

Class I Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 Class I Sensitivity/MFI: 0
Class II Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 Class II Sensitivity/MFI: 0
MIC Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 HNA Sensitivity/MFI: 0

[WellPosition]	Sample ID	Class I	Class II	MIC	Raw	Count	Raw	Count	PC/NC
[2(1,B1)]	FL1-64	Positive	Positive	Negative	21.16	168	9278.56	148	438.5

Patient Name: _____
Patient ID: _____
Sec. Ab: _____ Treatment: _____
Saved By: 1,1 Saved Date: 11/22/2020
Confirmed By: _____ Confirmed Date: _____
Comment: _____
User Comment: _____

1, 1

11/22/2020 HLA Fusion™ 4.4.0.13925 Page 1 of 1

陽性/陰性の結果のみ表示される



VERITAS

Veritas Corporation

LABScreen Single Antigenの解析

解析画面

2桁、4桁表示の切り替え

nMFI値

グラフの拡大表示

アレル情報、CREG

自動判定結果(x6以上)を表示

判定結果入力欄

カットオフ、コントロール値

nMFIの確認

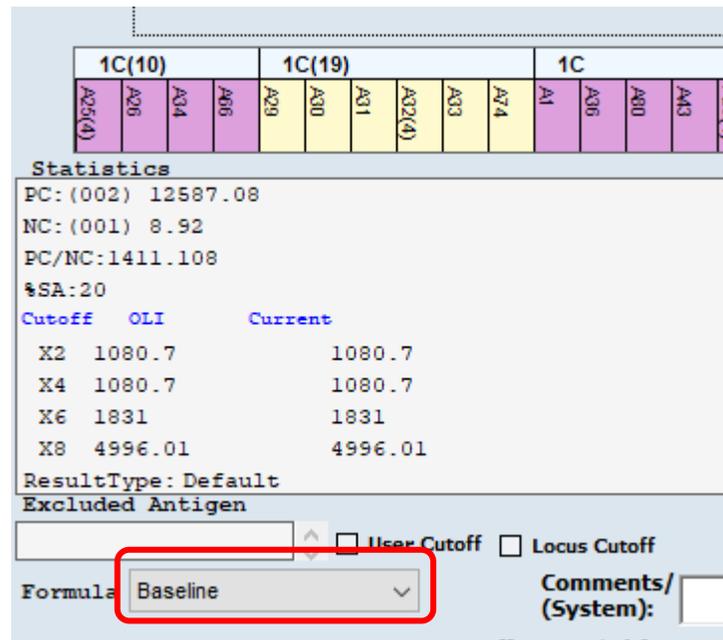
Raw Data

Spec.	>= X6	< X6	Mean (Ba...)
B54	1	0	15959.18
A2	3	0	15818.4
B38	1	0	15692
B55	1	0	14998.2
B59	1	0	14336.69
A69	1	0	13036.98
A68	2	0	12480.39

Parameter	Value
PC: (002)	5621.8
NC: (001)	45.4
PC/MC: 123.928	
%SA: 22	
Cutoff	OLI
X2	132.97
X4	333.82
X6	2764.68
X8	4204.81

nMFIとは

- nMFI = normalized Mean Fluorescence Intensity
 - LABScreenではTrimmed Meanの値をnMFIとして採用
 - 抗体価の目安として使用されるLABScreen製品の独自の値
- HLA Fusion上ではBaselineとして表示される



Statistics

PC: (002) 12587.08
NC: (001) 8.92
PC/NC: 1411.108
%SA: 20

Cutoff	OLI	Current
X2	1080.7	1080.7
X4	1080.7	1080.7
X6	1831	1831
X8	4996.01	4996.01

ResultType: Default
Excluded Antigen

Formula: **Baseline**

Bead ID	Sample Raw	Sample NC	LSNS Raw	LSNS NC	Baseline	YBG Ratio	Rxn
001	8.92	8.92	100	100	0	1	NC
002	12587.08	8.92	12966	100	0	10.88	PC
003	21706.26	8.92	93	100	21697.34	2516.6	8
004	68.88	8.92	85	100	59.96	9.08	1
005	51.32	8.92	73	100	42.4	7.88	1
006	91.56	8.92	113	100	69.64	9.08	1
007	32.35	8.92	80	100	23.43	4.53	1
008	6705.76	8.92	64	100	6696.84	1174.64	8
009	5369.77	8.92	162	100	5298.85	371.6	8
010	12402.76	8.92	147	100	12346.84	945.88	8
011	10979.8	8.92	116	100	10954.88	1061.14	8

nMFIの計算式

- 計算式

$$\text{nMFI} = (\text{検体の各ビーズ値} - \text{検体のNCビーズ値}) - (\text{NC血清の各ビーズ値} - \text{NC血清のNCビーズ値})$$

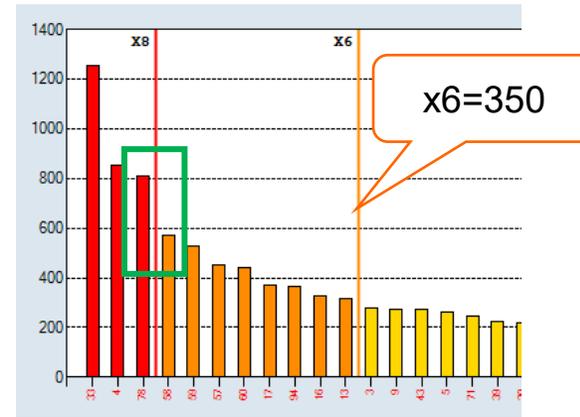
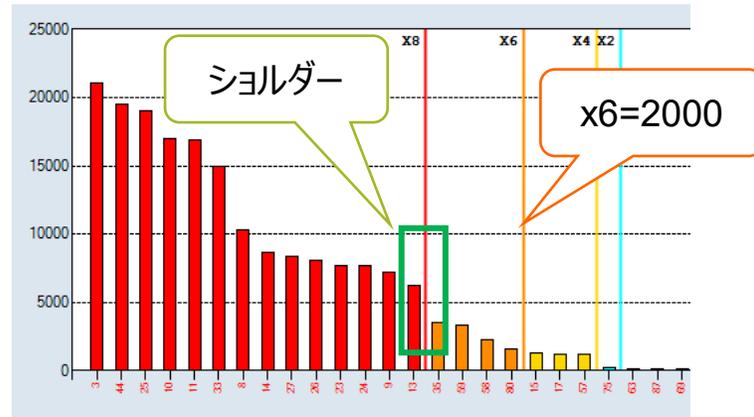
Bead ID	Sample Raw	Sample NC	LSNS Raw	LSNS NC	Baseline	NBG Ratio	Rxn	Count
077	17810.08	319.22	155.32	21.77	17357.31	7.82	8	142
028	16957.76	319.22	84.86	21.77	16575.45	13.63	8	140

nMFI

- (検体の各ビーズ値-検体のNCビーズ値)
→ (各検体におけるバックグラウンド除去)
- (NC血清の各ビーズ値 - NC血清のNCビーズ値)
→ (各ビーズのバックグラウンド除去)

自動判定方法

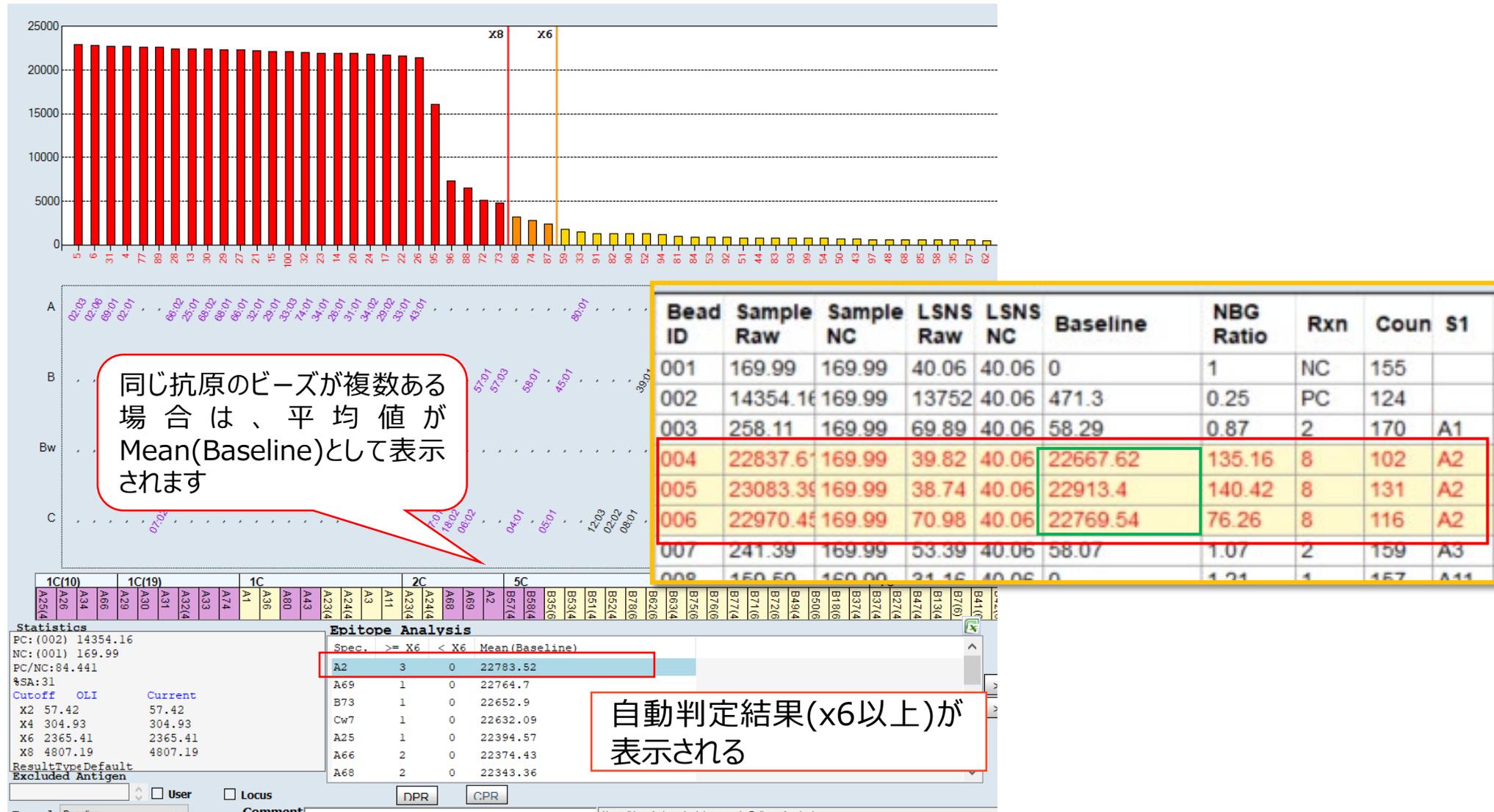
- HLA Fusionでは自動判定により、x8、x6、x4、x2を決定する
- デフォルトではx6以上が陽性となるように設定されている
 - x6のカットオフ値は検体により異なるため、判定の際はnMFI値も必ず確認する



- x8 : 検体内で1番高いビーズの蛍光値の70%以上
- x6 : 30%以上
- x4 : 5%以上
- x2 : 2%以上

CREGとショルダー（前後のビーズとのnMFI値の差）も加味して判定される

自動判定結果の表示



結果判定

4行表示

アレルをダブルクリックすることで4行で記録

自施設で設定したカットオフ値を使用している場合はチェックが入る

選択した抗原を1つずつ記録

枠内に表示されている抗原/アレルが陽性抗体としてレポートに表示される

陰性判定

自動判定で陽性と判定された抗原を全てまとめて記録

Spec.	>= X6	< X6	Mean (Ba...)
B54	1	0	15959.18
A2	3	0	15818.4
B38	1	0	15692
B55	1	0	14998.2
B59	1	0	14336.69
A69	1	0	13036.98
A68	2	0	12480.39

解析結果の確定

Statistics:
:(002) 8868.94
:(001) 26.5
/NC:334.677
i:17
off OLI Current
2 131.76 131.76
4 350.58 350.58
6 2480.59 2480.59
8 4338.21 4338.21
sultType: Modified
cluded Antigen

Spec.	>= X6	< X6	Mean (Ba...)
DQ5	2	0	16891.46
DQA1*01:03	2	0	16810.37
DQA1*01:01	2	0	16179.24
DQ6	6	0	14615.91
DQA1*01:02	4	0	13874.79
DR52	3	0	7024.46
DQA1*03:03	1	0	4532.36

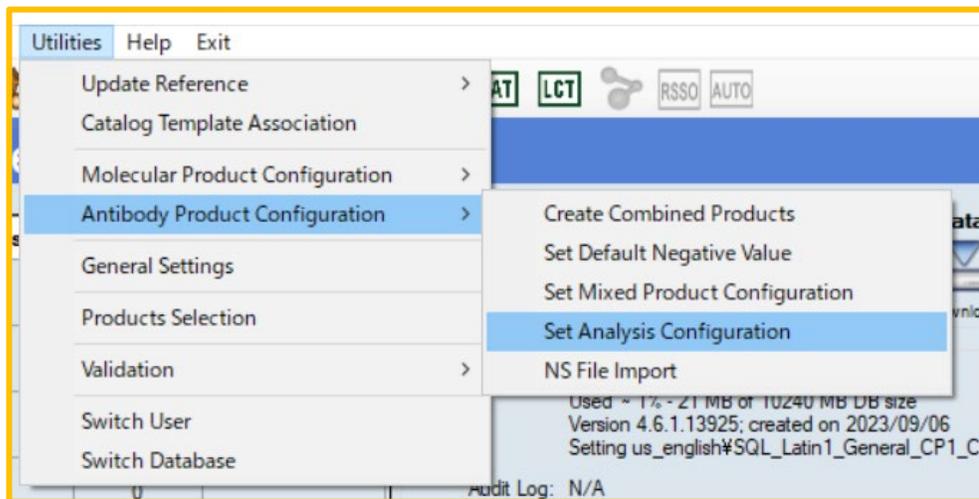
Ab Assignment Epitope Assignment
Final Assignment PAg DAg Manual New
Spec. TP FP TN FN R %Inc. Str. Avg.
DQ5
DQA1*01:03
DQA1*06:04
X Assign -ve
Combine
Other Assignment: More Test Raw Data Save>> Confirm>

陽性と判定したアレルがFinal Assignment欄に入力されていることを確認

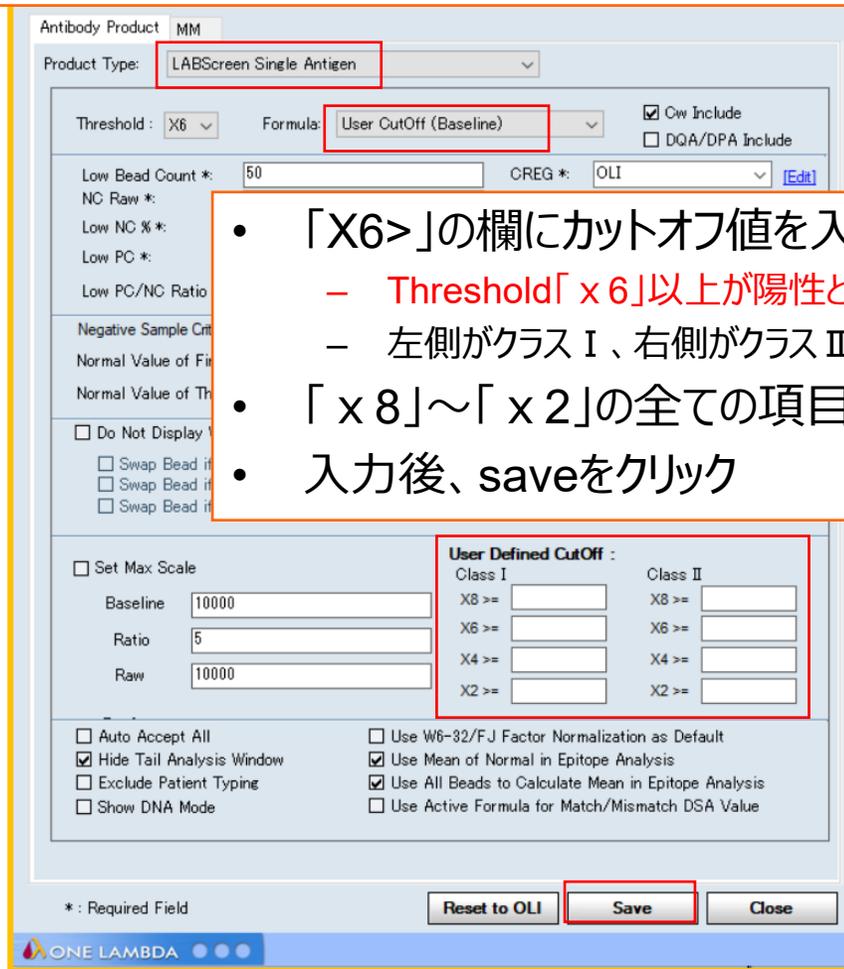
- ・グラフ内のアレルをダブルクリックしたものは、ピンクでハイライトされる
- ・削除する際は「×」をクリック

最後に「Save」をクリックして保存

カットオフ値の変更 LSSA

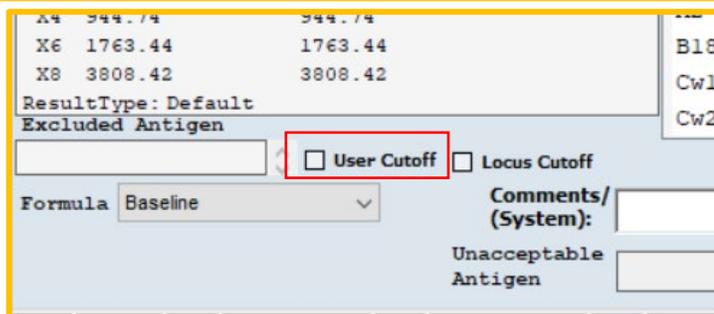


- Product Type : LABScreen Single Antigenを選択
- Formula : User Cutoff(Baseline)を選択

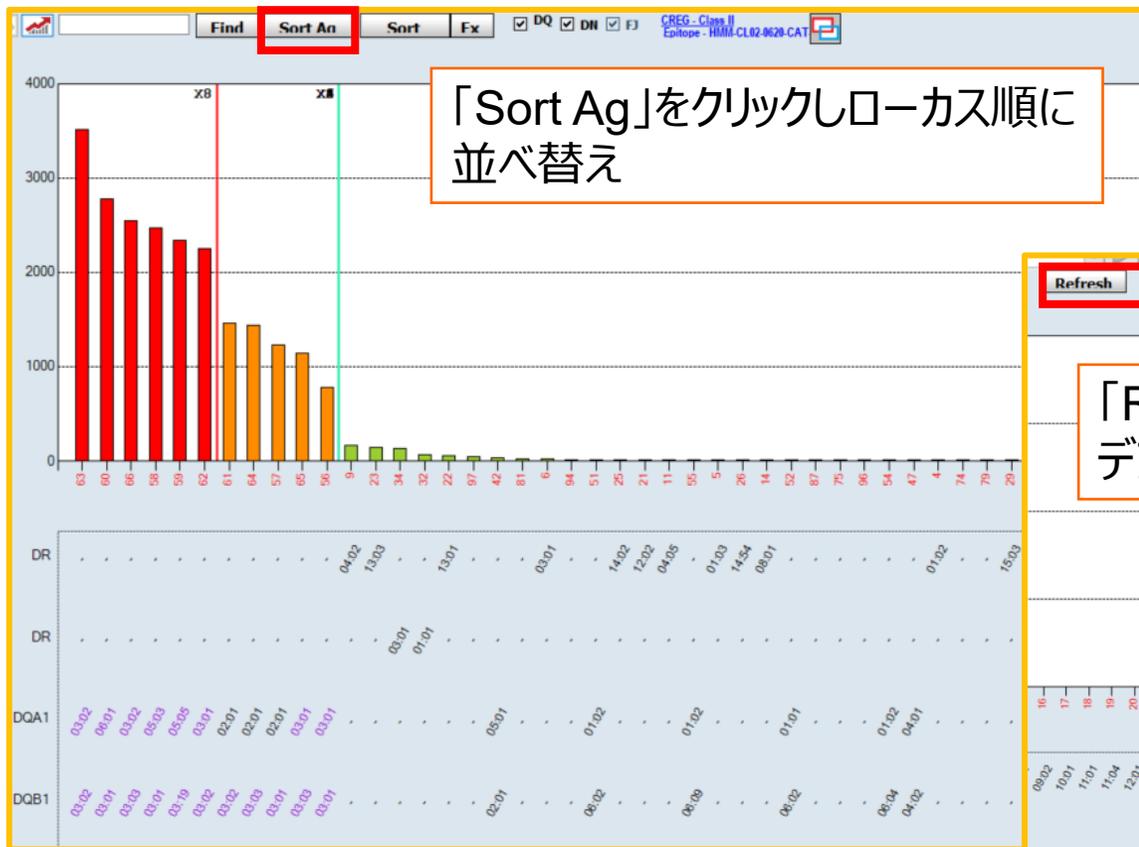


- 「X6>」の欄にカットオフ値を入力
 - Threshold「x 6」以上が陽性と判定される
 - 左側がクラス I、右側がクラス II
- 「x 8」～「x 2」の全ての項目に数値を入力
- 入力後、saveをクリック

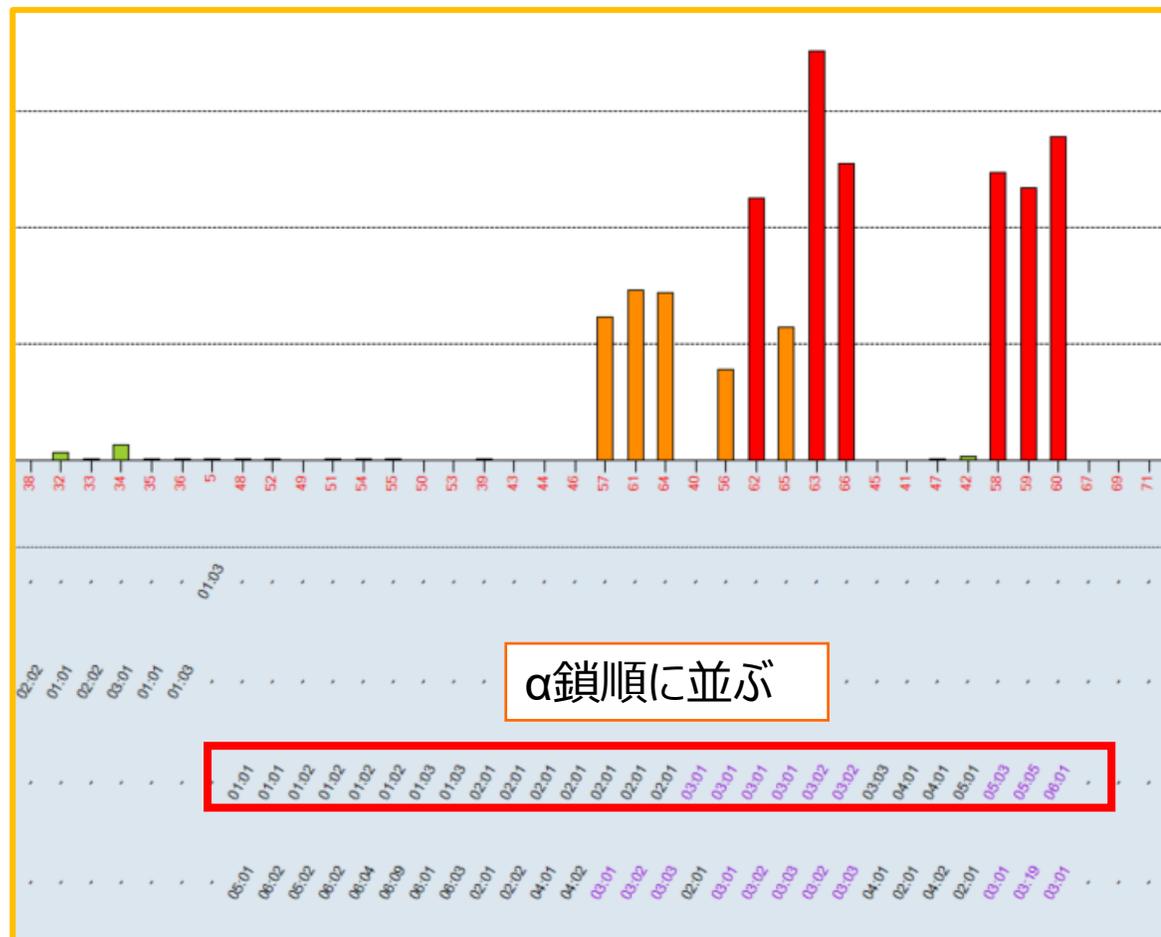
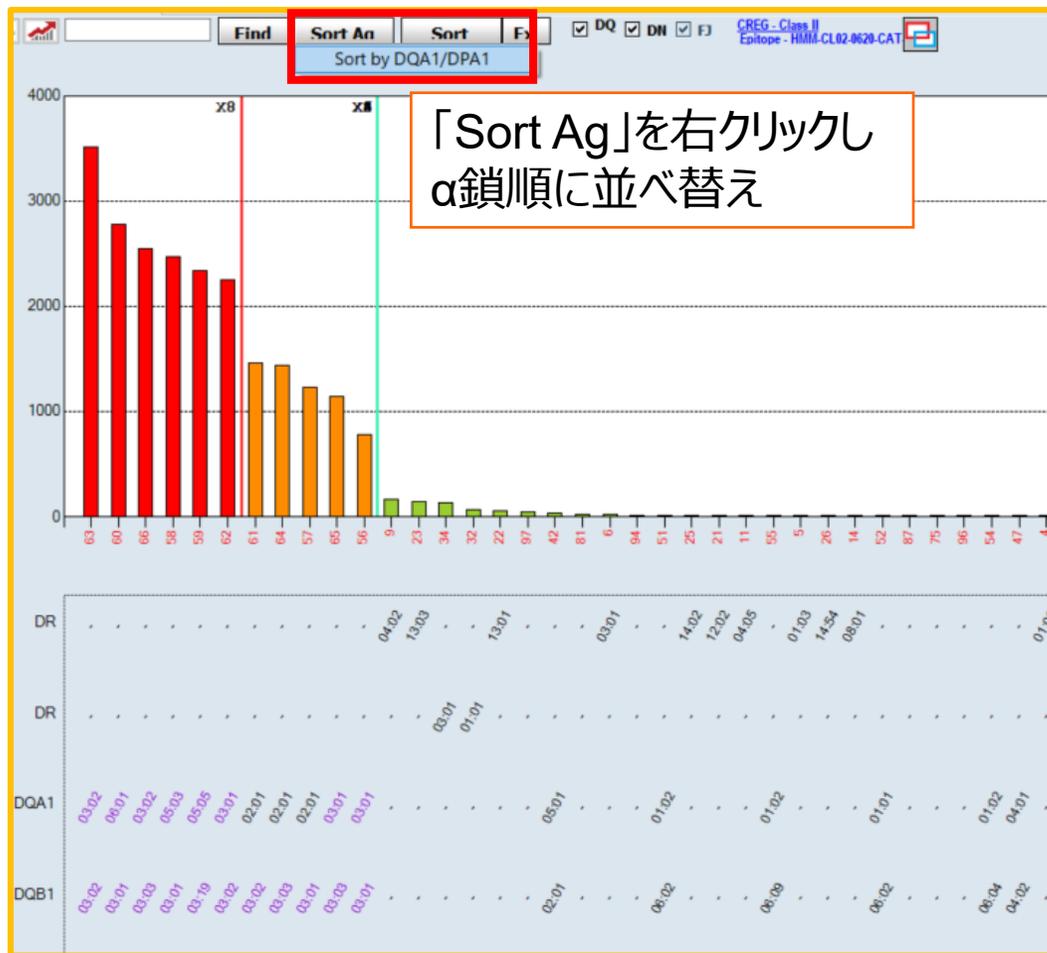
解析画面において、独自で設定したカットオフ値とデフォルトのカットオフ値の切り替えができる



ローカス順に並べ替える



ローカス順に並べ替える



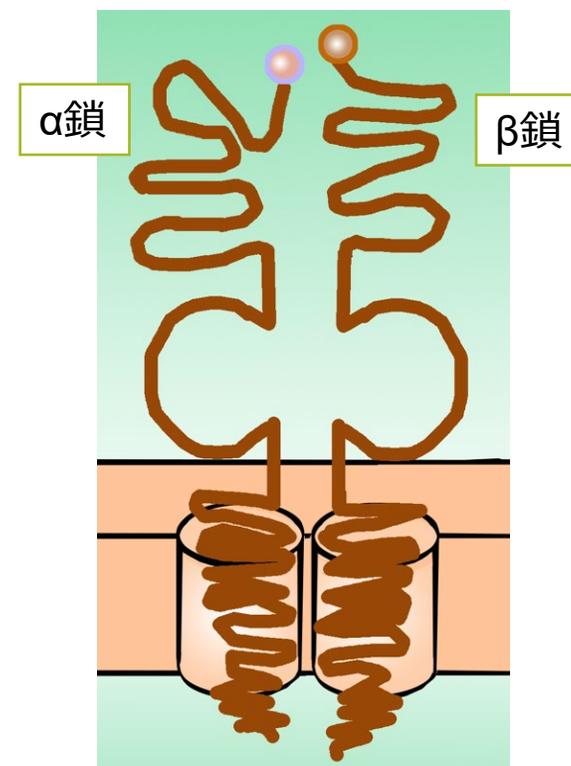
クラス2の解析

- DP及びDQのビーズには2種類のHLA抗原が貼りついている
- 判定する場合は、該当ビーズの反応がα鎖とβ鎖のどちらによる反応であるかを判断することが必要

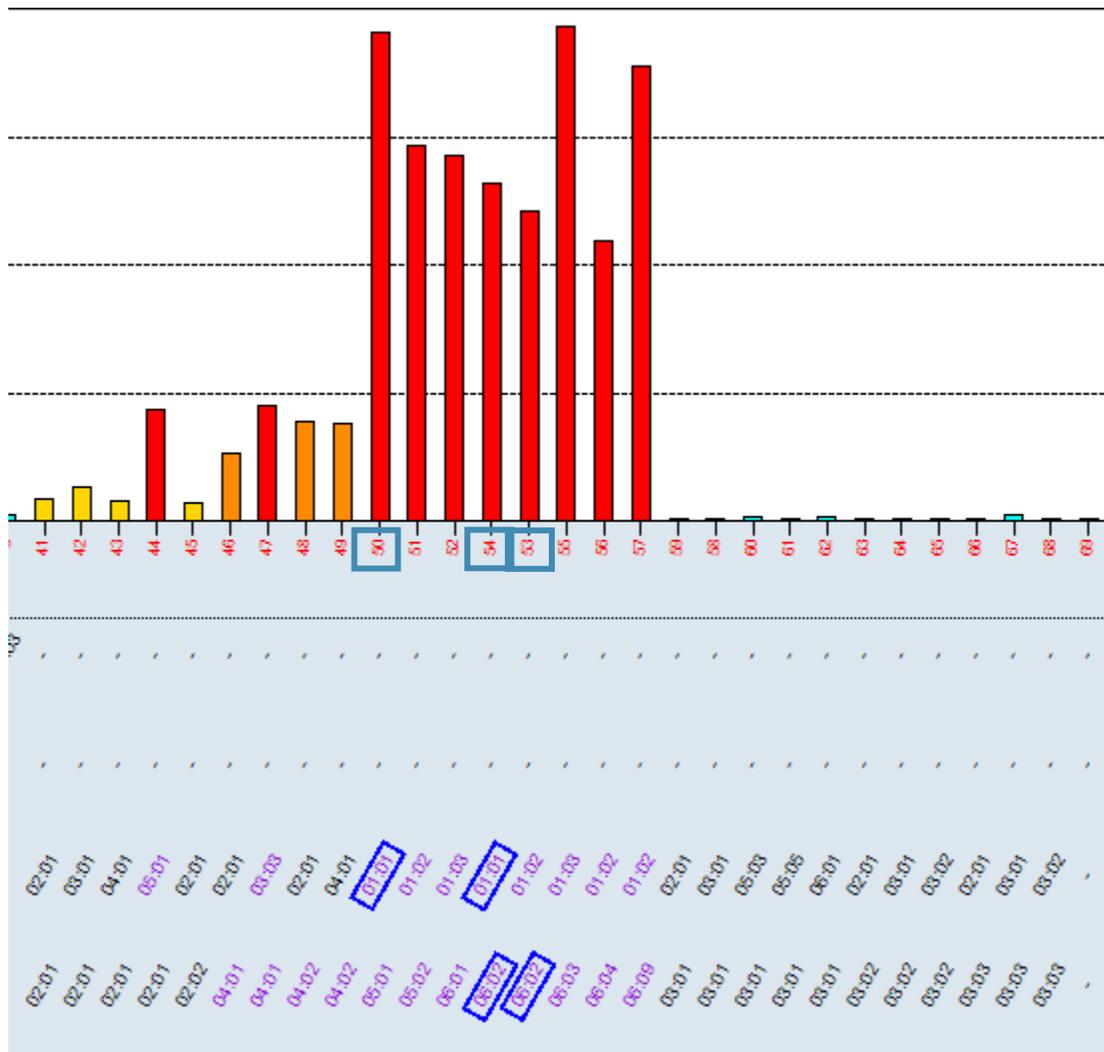
データシートの例

40	rDQ0201A0301	DQA1*03:01,DQB1*02:01	DQ2
41	rDQ0201A0401	DQA1*04:01,DQB1*02:01	DQ2
42	C4987DQ0201	DQA1*05:01, DQB1*02:01	DQ2
43	rDQ0202A0201	DQA1*02:01, DQB1*02:02	DQ2
44	rDQ0401A0201	DQA1*02:01, DQB1*04:01	DQ4
45	C4107DQ0401	DQA1*03:03, DQB1*04:01	DQ4
46	rDQ0402A0201	DQA1*02:01, DQB1*04:02	DQ4
47	rDQ0402A0401	DQA1*04:01, DQB1*04:02	DQ4
48	C4905DQ0501	DQA1*01:01, DQB1*05:01	DQ5

Class 2の構造



クラス2の解析例-1



* 注意事項 *

本資料においては、簡易的にx6以上(赤とオレンジのグラフ)を陽性と仮定し説明しております

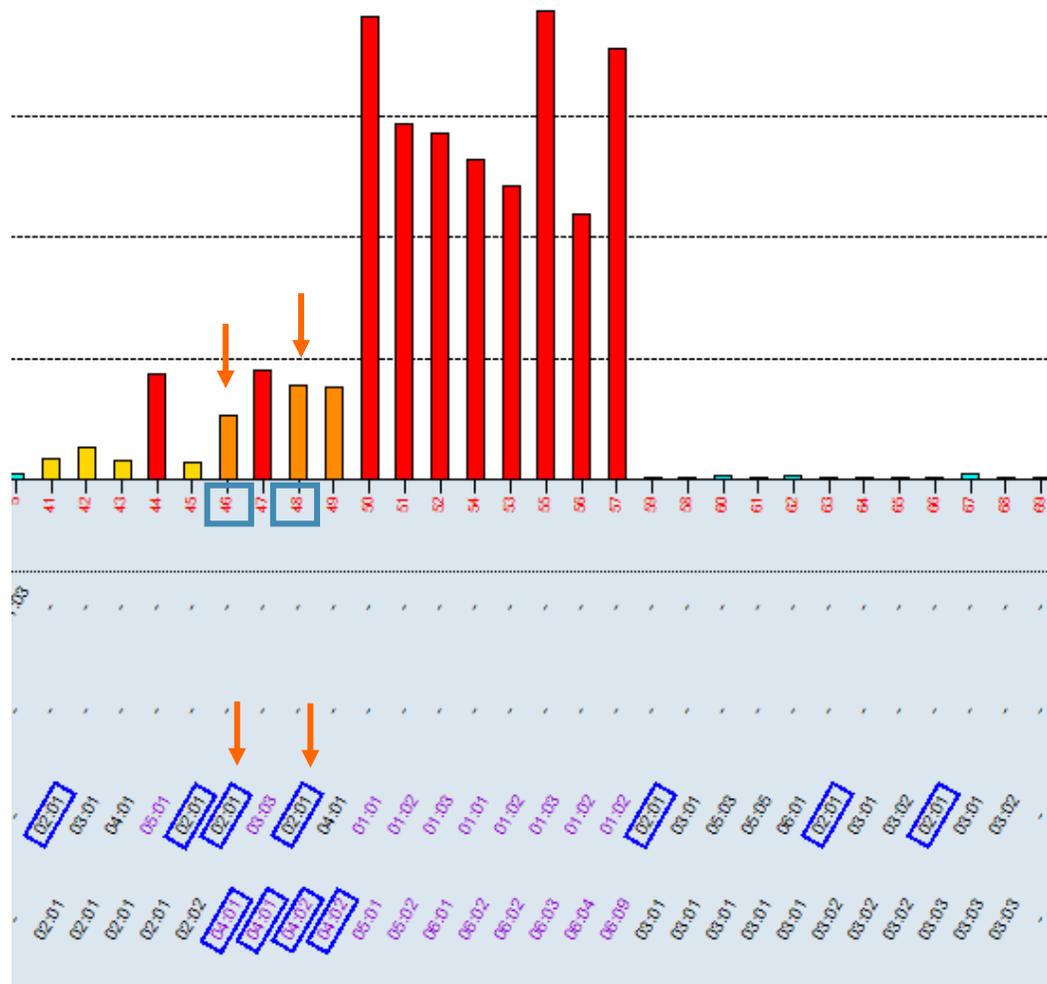
実際のカットオフ値は各施設様でご検討をお願い致します

同じアレルが結合している全てのビーズが陽性であれば当該アレルは陽性と判定

例) DQA1*01:01(50,54番ビーズ)

DQB1*06:02(53,54番ビーズ)

クラス2の解析例-2



同じアレルが結合しているビーズが陽性と陰性が混在する場合
DQA1*02:01を例に説明します

DQA1*02:01が結合しているビーズが7個ありますが、陰性のビーズがあるのでDQA1*02:01は陰性です

46と48番ビーズはなぜ陽性なのか？

→ビーズ構成を確認します

ビーズ番号	DQA1	DQB1
46	02:01	04:01
48	02:01	04:02

DQB1*04:01は47番ビーズにも結合

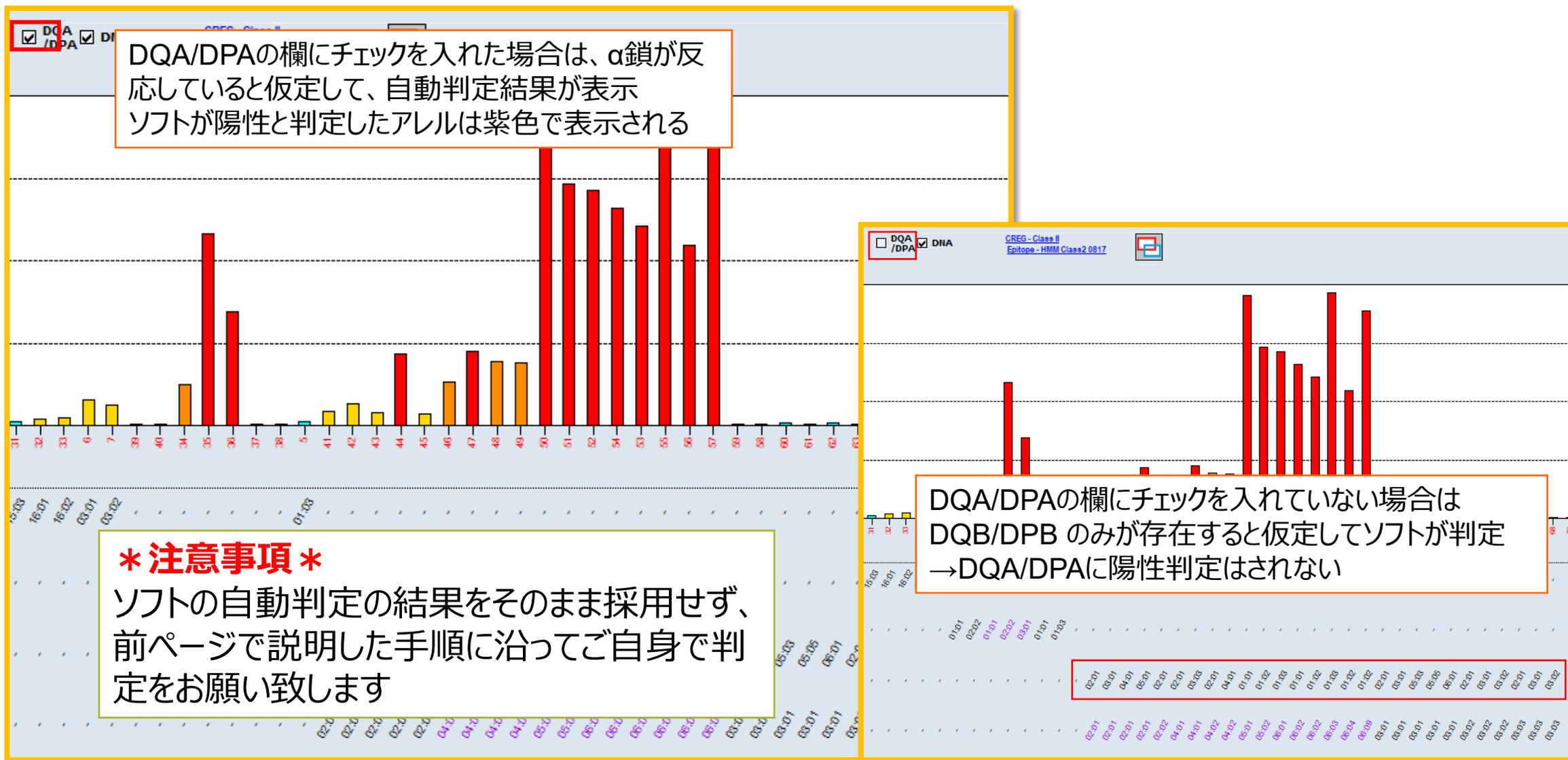
→47番は陽性= DQB1*04:01は陽性

DQB1*04:02は49番ビーズにも結合

→49番は陽性= DQB1*04:02は陽性

上記より46と48番ビーズはDQB1抗体による陽性反応であるため、DQA1*02:01は陰性と判定ができます

クラス2の解析例-3



レポート

The screenshot shows the HLA Fusion software interface. The 'Reports' menu is highlighted in the top navigation bar. Below it, the 'Generic Antibody' sub-menu is open, showing options like 'Antibody Custom', 'Antibody Screening/Identification', and 'Antibody Screening/Single Antigen'. The 'Custom Antibody Screening Report Setup' dialog box is open, displaying various configuration options for the report. A red box highlights the 'Setup' button in the bottom right corner of the dialog box. A text box with the Japanese text 'レポートに出力する項目を選択' (Select items to output to the report) is overlaid on the dialog box.

Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Generic Typing LABType MicroSSP Generic Antibody LABScreen Specialty Statistical Miscellaneous My Favorite Tools

Antibody Custom
Antibody Screening/Identification
Antibody Screening/Single Antigen

Custom Antibody Screening Report Setup

HLA Fusion™

Type or enter the report name:
LABScreen

Lab Information

Patient Information
Check All **Uncheck All**
 Patient ID, Name (REQUIRED for this group)
 Project Type
 SSN
 Ethnicity, DOB, Gender
 Disease, Status, Blood, Transplant Type
 Address, Phone, Email
 Spouse, Emg. Contact, Employer
 DCN, Hospital, Division
 UNOS CPRA
 Donor Info
 Molecular Typing Sero Typing
 Antibody Assignment
 Match / Mismatch
 Add MFI Baseline
 Acceptable Antigens
 Unacceptable Antigens
 AM DFC ETKAS DFC
 Unacceptable Epitopes

Sample Information
Check All **Uncheck All**
 Sample ID (REQUIRED) Barcode
 System Comments User Comments
 Sample Source Dilution Factor

Session Information
Check All **Uncheck All**
 Session ID/Date (REQUIRED for this group)
 Lumindex Info
 Session Details: Catalog ID, Locus Type, Test Position, Date, NS Sample
 More Tests and Tests Remarks
 Quantiplex/SFI

Test Configuration
Check All **Uncheck All**
 User Settings:
Excluded Antigens, Positive Region Threshold, Normalization Formula, Allele Level
 NU and PG Values, % PHA-or- %SA and Cutoffs by Region

Overall Results/Assignments
Check All **Uncheck All**
 Overall Pos/Neq Other
 % PRA % Donor PRA
 Antibody New Antibody
 Possible Epitope Amino Acid Position

Epitope Analysis Results
Check All **Uncheck All**
 Antibody Specificity (REQUIRED for this group)
 CREG Analysis Details:
TP, FN, Mean (Raw) of Positives
 CREG Chart, Circle DSA

Tail Analysis Results
Check All **Uncheck All**
 Antibody Specificity (REQUIRED for this group)
 Tail Analysis Details:
TP/FP/FN/TN, R Value, Average Score, % Inclusion, Strength Index
 Manual Tail Assignment

Test and Catalog Details
Check All **Uncheck All**
 Bead ID or Test Well (REQUIRED for this group)
 Test Values: Rxn, Raw, Normalized, Count
 SFI Raw, SFI Normal
 Sero Specificity **Sort by:** Bead ID
 ASC DESC
 Allele Specificity

Cutoff Summary
 Bead MFI Chart
 Raw Data Baseline
 Sort Antigen Using HLA Order
 Rxn Score Sort Alphanumerically

1 Sample Per Report

Sort By:

Customize Report

Setup

レポートに出力する項目を選択

ONE LAMBDA

表示例-1

Custom Antibody Screening Report Setup

HLA Fusion™

Type or enter the report name*: LABScreen

Lab Information

Patient Information

- Patient ID, Name (REQUIRED for this group)
- Project Type
- SSN
- Ethnicity, DOB, Gender
- Disease, Status, Blood, Transplant Type
- Address, Phone, Email
- Spouse, Emg. Contact, Employer
- DCN, Hospital, Division
- UNOS CPRA
- Donor Info
- Molecular Typing Sero Typing
- Antibody Assignment
- Match / Mismatch
- Add MFI Baseline
- Acceptable Antigens
- Unacceptable Antigens
- AM DFC ETKAS DFC
- Unacceptable Epitopes

Test Configuration

- User Settings
- Excluded Antigen Threshold, N Level
- NO and PC V and Cutoffs

Overall Results/Assessment

- Overall Pos/ % PRA
- Antibody
- Possible Epitope

Epitope Analysis Report

- Antibody Specificity
- CREG Analysis: TP, FN, Mear
- CREG Chart

Sample Information

- Sample ID (REQUIRED)
- System Comments
- Sample Source
- Barcode
- User Comments
- Dilution Factor

Session Information

- Session ID/Date (REQUIRED for this group)
- Luminex Info
- Session Details: Catalog ID, Locus Type, Test Position, Date, NS Sample
- More Tests and Tests Remarks
- Quantiplex/SFI

LABScreen レポート名

Approved By:

Lab Name 1
Institute:
Street: 1
Lab City:
Region:
Country:
Notes:

Lab Code
Contact: 1
Email: chiefujwara@veritastk.co.jp
Phone:
Fax:

Province:
Postal Code:

施設情報

Patient Name:
Project Type
Ethnicity:
DOB: Gender: UNK SSN:
Disease
Transplant Type
City:
Address
Phone:
Email:
Blood Type
Spouse:
Emergency Contact:
Employer: Division:
Hospital
UNOS CPRA: as of
Donor PRA:
Donor Type

Donor Center ID:
From Other Facility: NO

Patient/Donor:
AMDFC:
ETKAS DFC:
Molecular Typing
Sero Typing
Antibody Assignment Class I:
Class II:
MIC

患者、ドナー情報

Patient Donor Match/ Mismatch

Acceptable Antigens
Unacceptable Antigens
Unacceptable Epitope- Class I:
Unacceptable Epitope- Class II:
Unacceptable Epitope- MICA:

Session ID: 200908_LS1A04011_NC023-2New_20200908_142249 Luminex: xPONENT/FlexMAP 5D-4.5.2290 / SN BMBDD14251002
Catalog: LS1A04NC23_011_00 Test Pos: 74(1,B10)

Quantiplex/SFI Used

Sample ID: FL1-PC Local ID:

Sec. Ab: Sample Date:  Test Date: 9/8, 2020

Treatment

Sample Source: Dilution Factor:

Saved By: 1,1 Date: 9/8, 2020 NS Sample: NC

Confirmed By: Date: Test Type: Single Class I

More Tests

Comment:

User Comment:

Batch Imported

カタログID、LABScan情報

表示例-2

Custom Antibody Screening Report Setup

HLA Fusion™

Type or enter the report name*: LABScreen

Lab Information

Patient Information

Patient ID, Name (REQUIRED for this group)
 Project Type
 SSN
 Ethnicity, DOB, Gender
 Disease, Status, Blood, Transplant Type
 Address, Phone, Email
 Spouse, Emg. Contact, Employer
 DCN, Hospital, Division
 UNOS CPRA
 Donor Info
 Molecular Typing Sero Typing
 Antibody Assignment
 Match / Mismatch
 Add MFI Baseline
 Acceptable Antigens
 Unacceptable Antigens
 AM DFC ETKAS DFC
 Unacceptable Epitopes

Test Configuration

User Settings:
 Excluded Antigens, Positive Threshold, Normalization Factor
 NC and PC Values, % PRA and Cutoffs by Region

Overall Results/Assignments

Overall Pos/Neg Overall %
 % PRA % Negative
 Antibody Negative
 Possible Epitope Antigen

Epitope Analysis Results

Antibody Specificity (REQUIRED)
 CREG Analysis Details: TP, FN, Mean (Raw) of Positives
 CREG Chart, Circle DSA

Sample Information

Sample ID (REQUIRED) Barcode
 System Comments User Comments
 Sample Source Dilution Factor

Session Information

Session ID/Date (REQUIRED for this group)
 Luminex Info
 Session Details: Catalog ID, Locus Type, Test Position, Date, NS Sample
 More Tests and Tests Remarks
 Quantiplex/SFI

Donor ID: 222
 Serology Typing: A2,A26,B8,B60,Bw6,Cw7,Cw8,DR4,DR12,DR52,DR53,DQ7,DQ8,DP2,DP6
 Molecular Typing: A*02:06,A*26:01,B*08:01,B*40:01,C*07:02,C*08:01,DRB1*04:07,DRB1*12:01,DQA1*03:01,DQA1*05:05,DQB1*03:01,DQB1*03:02,DPA1*01:03,DPA1*01:03,DPB1*02:01,DPB1*06:01

Serology Typing	Molecular Typing	MFI	(Baseline)	Match/ Mis Match
A2				Mismatch not in Final Assignment
	A*02:01	14.89	0	
	A*02:03	12.47	0	
	A*02:06	20.62	0	Mismatch not in Final Assignment
A26				Mismatch not in Final Assignment
	A*26:01	32.77	0	Mismatch not in Final Assignment
B8				Mismatch in Final Assignment
	B*08:01	2315.36	2253	Mismatch not in Final Assignment
B60				Mismatch in Final Assignment
	B*40:01	9004.45	8930.45	Mismatch not in Final Assignment
Cw7				Match
	C*07:02	135.77	2.55	Match
Cw8				Mismatch in Final Assignment
	C*08:01	4698.46	4609.17	Mismatch not in Final Assignment

赤 : 陽性と判定したDSA
 黄色 : 陰性のDSA
 緑 : ドナーと患者で共通の抗原/アレル

ONE LAMBDA

表示例-3

Custom Antibody Screening Report Setup

HLA Fusion™

Type or enter the report name*: LABScreen

Lab Information

Patient Information

Patient ID, Name (REQUIRED for this group)

Project Type

SSN

Ethnicity, DOB, Gender

Disease, Status, Blood, Transplant Type

Address, Phone, Email

Spouse, Emg. Contact, Employer

DCN, Hospital, Division

UNOS CPRA

Donor Info

Molecular Typing Sero Typing

Antibody Assignment

Match / Mismatch

Add MFI Baseline

Acceptable Antigens

Unacceptable Antigens

AM DFC ETKAS DFC

Unacceptable Epitopes

Sample Information

Sample ID (REQUIRED)

System Comments

Sample Source

Barcode

User Comments

Dilution Factor

Session Information

Session ID/Date (REQUIRED for this group)

Luminex Info

Session Details: Catalog ID, Locus Type, Test Position, Date, NS Sample

More Tests and Tests Remarks

Quantiplex/SFI

Test Configuration

User Settings:

Excluded Antigens, Positive Region Threshold, Normalization Formula, Allele Level

NC and PC Values, % PRA -or- %SA and Cutoffs by Region

Overall Results/Assignments

Overall Pos/Neg

% PRA

Antibody

Possible Epitope

Other

% Donor PRA

New Antibody

Amino Acid Position

Epitope Analysis Results

Antibody Specificity (REQUIRED for this group)

CREG Analysis Details: TP, FN, Mean (Raw) of Positives

CREG Chart, Circle DSA

Test Results

	Class I	Class II
Overall (Pos/Neg):	Positive	
%PRA - or - %SA:	15	
Antibody Assignment:	B48, B41, B81, B45, B50, B60, B72, B61, B78, B76, B62, B71, B18, B39, B35, B75, B*48:01, B*40:01	

解析画面で陽性と記録した抗原/アレルが表示

Epitope Analysis

	Specificity	DSA	TP	FN	Mean (Baseline) of Positives
Class I	B45		1	0	26434.08
	B76		1	0	24681.3
	B44		2	0	23915
	A33		2	0	21937.27
	A68		2	0	20932.5
	A34		2	0	20209.9
	A26		1	0	19443.58
	A31		1	0	19219.48
	A66				
	A25				
	B82				
	A69				
	A74				
	A29				
	A3		1	0	14955.75

DSA情報は患者情報とドナー情報を入力したときのみ表示

CREG Table

表示例-4

Custom Antibody Screening Report Setup

HLA Fusion™

Type or enter the report name*: LABScreen

Lab Information

Patient Information

Patient ID, Name (REQUIRED for this group)

Project Type

SSN

Ethnicity, DOB, Gender

Disease, Status, Blood, Transplant Type

Address, Phone, Email

Spouse, Emg. Contact, Employer

DGN, Hospital, Division

UNOS CPRA

Donor Info

Molecular Typing Sero Typing

Antibody Assignment

Match / Mismatch

Add MFI Baseline

Acceptable Antigens

Unacceptable Antigens

AM DFC ETKAS DFC

Unacceptable Epitopes

Sample Information

Sample ID (REQUIRED) Barcode

System Comments User Comments

Sample Source Dilution Factor

Session Information

Session ID/Date (REQUIRED for this group)

Luminex Info

Session Details: Catalog ID, Locus Type, Test Position, Date, NS Sample

More Tests and Tests Remarks

Quantiplex/SFI

Test Configuration

User Settings:

Excluded Antigens, Positive Region Threshold, Normalization Formula, Allele Level

NC and PG Values, % PRA --or-- %SA and Cutoffs by Region

Overall Results/Assignments

Overall Pos/Neg Other

% PRA % Donor PRA

Antibody New Antibody

Possible Epitope Amino Acid Position

Epitope Analysis Results

Antibody Specificity (REQUIRED for this group)

CREG Analysis Details: TP, FN, Mean (Raw) of Positives

CREG Chart, Circle DSA

Tail Analysis Results

Antibody Specificity (REQUIRED for this)

Tail Analysis Details: TP/FP/FN/TN, R Value, Average Score, % Inclusion, Strength Index

Manual Tail Assignment

Test and Catalog Details

Bead ID or Test Well (REQUIRED for this)

Test Values: Rxn, Raw, Normalized, Count

SFI Raw, SFI Normal

Sero Specificity

Allele Specificity

Sort by: Bead ID

ASC DESC

Cutoff Summary

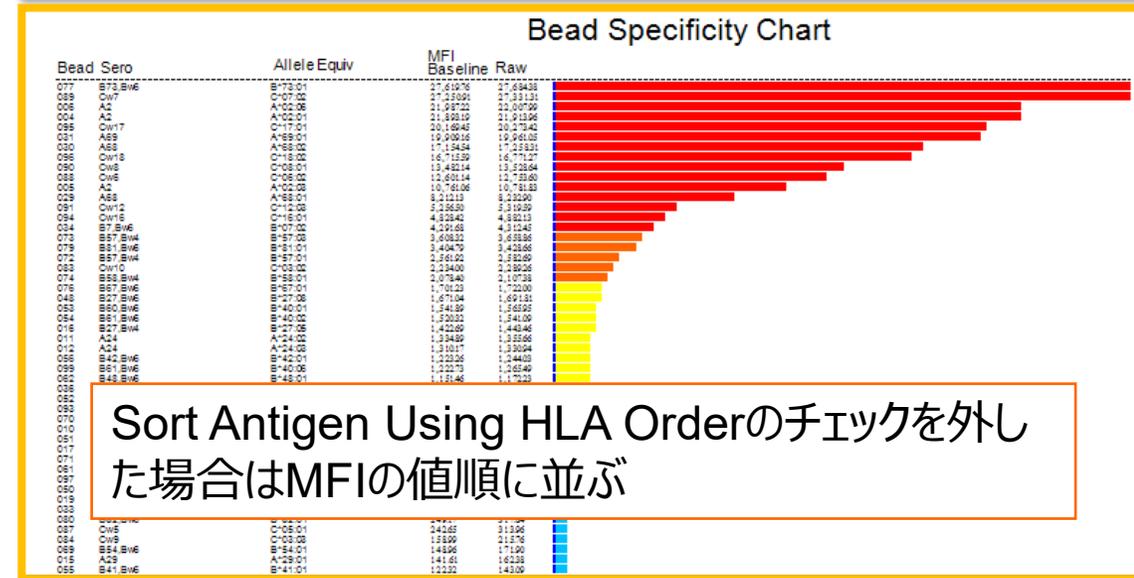
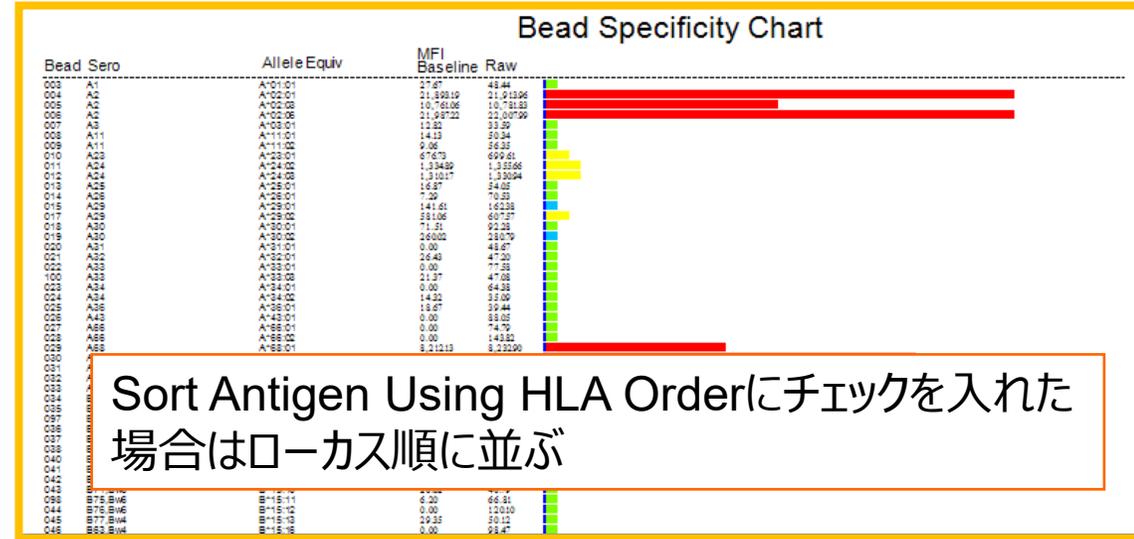
Bead MFI Chart

Raw Data Baseline

Sort Antigen Using HLA Order

Rxn Score Sort Alphabetically

Buttons: Check All, Uncheck All, Save, Delete, Cancel



設定例

Custom Antibody Screening Report Setup

HLA Fusion™

Type or enter the report name*:
test

Lab Information

Patient Information
 Lab Information
Check **Uncheck**

- Patient ID, Name (REQUIRED for this group)
- Project Type
- SSN
- Ethnicity, DOB, Gender
- Disease, Status, Blood, Transplant Type
- Address, Phone, Email
- Spouse, Emg. Contact, Employer
- DCN, Hospital, Division
- UNOS CPRA
- Donor Info
- Molecular Typing Sero Typing
- Antibody Assignment
- Match / Mismatch
- Add MFI Baseline
- Acceptable Antigens
- Unacceptable Antigens
- AM DFC ETKAS DFC
- Unacceptable Epitopes

Sample Information
Check **Uncheck**

- Sample ID (REQUIRED) Barcode
- System Comments User Comments
- Sample Source Dilution Factor

Session Information
Check **Uncheck**

- Session ID/Date (REQUIRED for this group)
- Luminex Info
- Session Details: Catalog ID, Locus Type, Test Position, Date, NS Sample
- More Tests and Tests Remarks
- Quantiplex/SFI

Test Configuration
Check **Uncheck**

- User Settings:
Excluded Antigens, Positive Region Threshold, Normalization Formula, Allele Level
- NC and PC Values, % PRA -or- %SA and Cutoffs by Region

Overall Results/Assignments
Check **Uncheck**

- Overall Pos/Neg Other
- % PRA % Donor PRA
- Antibody New Antibody
- Possible Epitope Amino Acid Position

Epitope Analysis Results
Check **Uncheck**

- Antibody Specificity (REQUIRED for this group)
- OREG Analysis Details:
TP, FN, Mean (Raw) of Positives
- OREG Chart, Circle DSA

Tail Analysis Results
Check **Uncheck**

- Antibody Specificity (REQUIRED for this group)
- Tail Analysis Details:
TP/FP/FN/TN, R Value, Average Score, % Inclusion, Strength Index
- Manual Tail Assignment

Test and Catalog Details
Check **Uncheck**

- Bead ID or Test Well (REQUIRED for this group)
- Test Values: Rxn, Raw, Normalized, Count
- SFI Raw, SFI Normal
- Sero Specificity **Sort by** Sero Specificity ASC DESC
- Allele Specificity

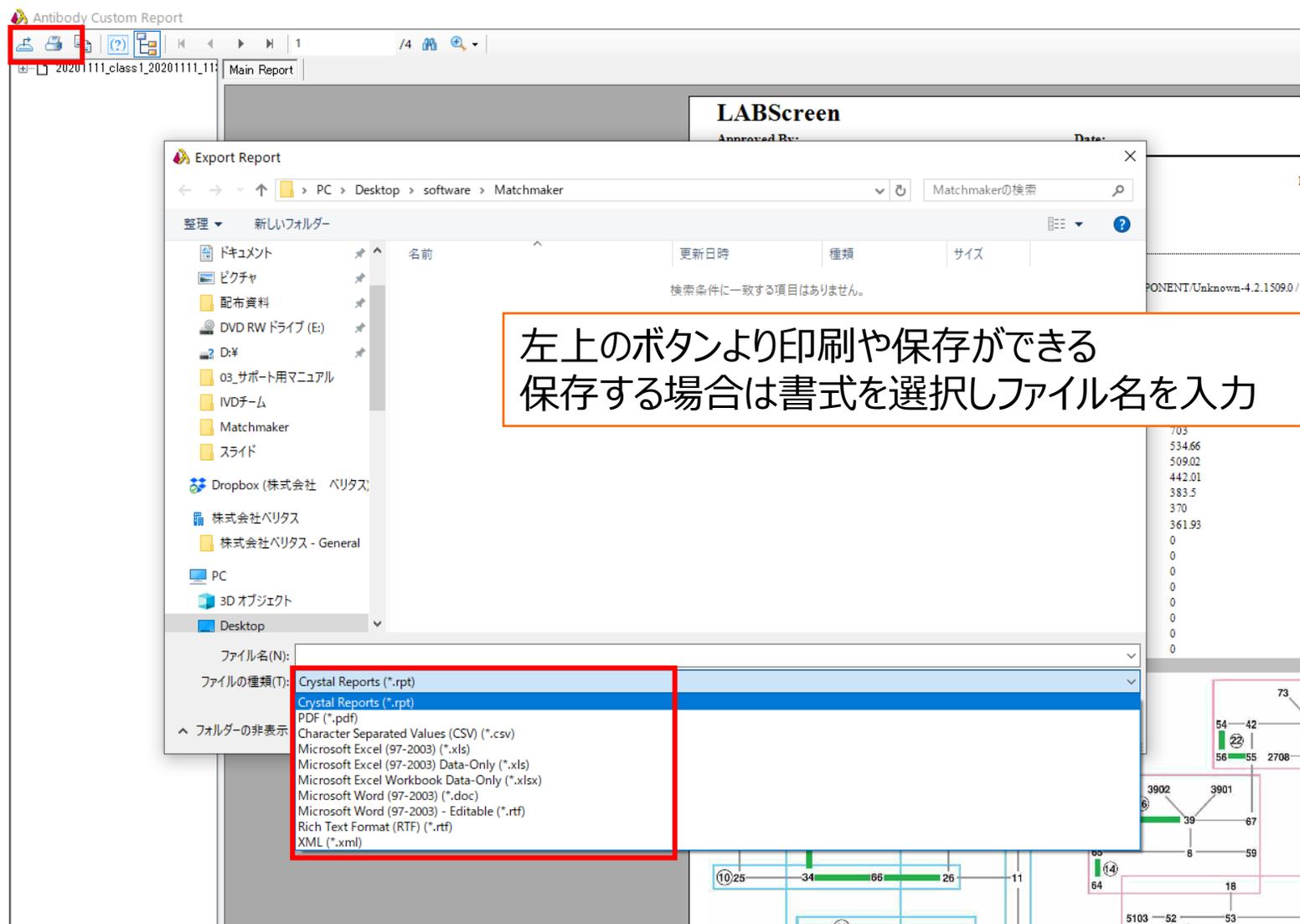
Cutoff Summary
 Cutoff Summary

- Bead MFI Chart
- Raw Data Baseline
- Sort Antigen Using HLA Order
- Rxn Score Sort Alphanumerically

Check All **Uncheck** **Save** **Delete** **Cancel**

ONE LAMBDA

印刷・保存



Antibody Custom Report

Export Report

PC > Desktop > software > Matchmaker

Matchmakerの検索

整理 新しいフォルダー

ドキュメント
ピクチャ
配布資料
DVD RW ドライブ (E:)
D:¥
03_サポート用マニュアル
IVDチーム
Matchmaker
スライド

Dropbox (株式会社 ベリタス)
株式会社ベリタス
株式会社ベリタス - General

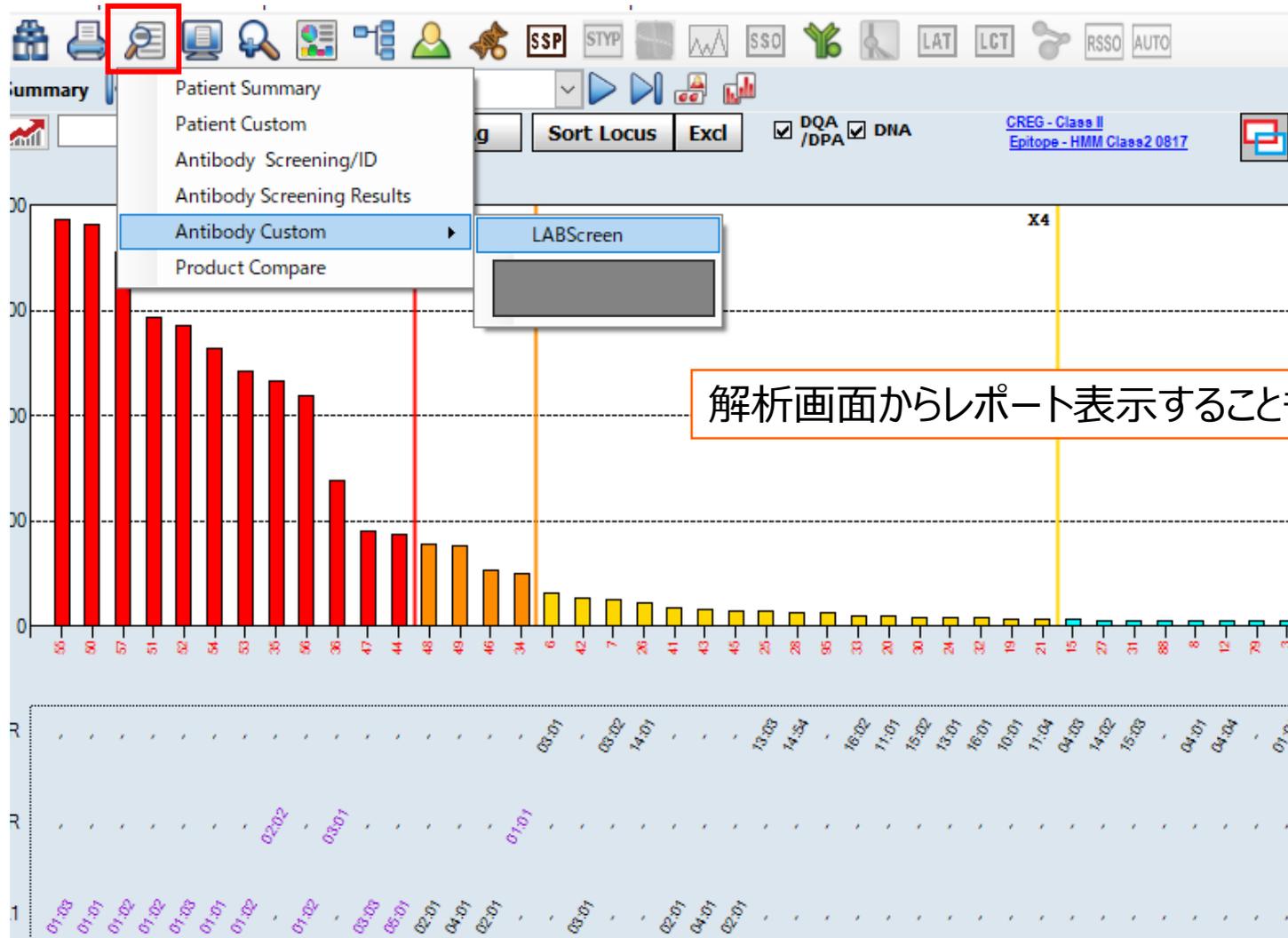
PC
3D オブジェクト
Desktop

ファイル名(N):
ファイルの種類(T): Crystal Reports (*.rpt)

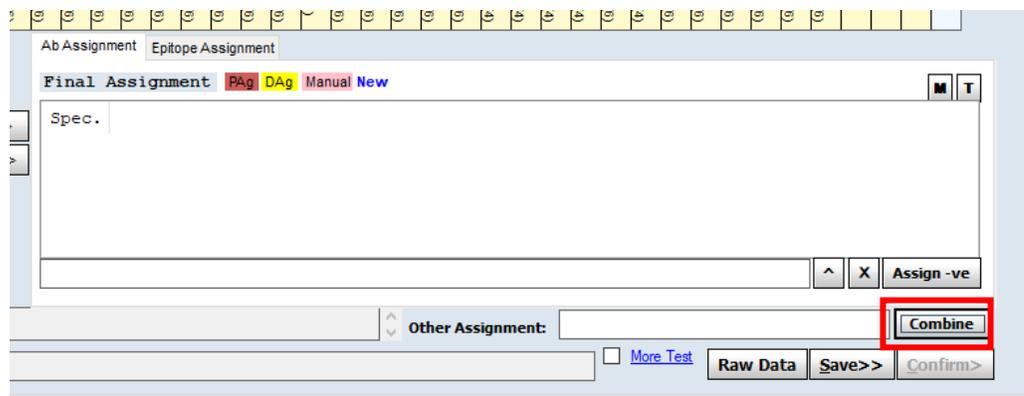
Crystal Reports (*.rpt)
PDF (*.pdf)
Character Separated Values (CSV) (*.csv)
Microsoft Excel (97-2003) (*.xls)
Microsoft Excel (97-2003) Data-Only (*.xls)
Microsoft Excel Workbook Data-Only (*.xlsx)
Microsoft Word (97-2003) (*.doc)
Microsoft Word (97-2003) - Editable (*.rtf)
Rich Text Format (RTF) (*.rtf)
XML (*.xml)

左上のボタンより印刷や保存ができる
保存する場合は書式を選択しファイル名を入力

解析画面からのレポートの表示



Single AntigenとSupplementのデータの結合



右下の「Combine」をクリック

Sample名が同じデータのみ結合可能

LABScreen Combined Analysis
Current Sample ID: 111
Patient ID: [redacted]
Analysis Date: 2019/03/04 - 2021/08/16

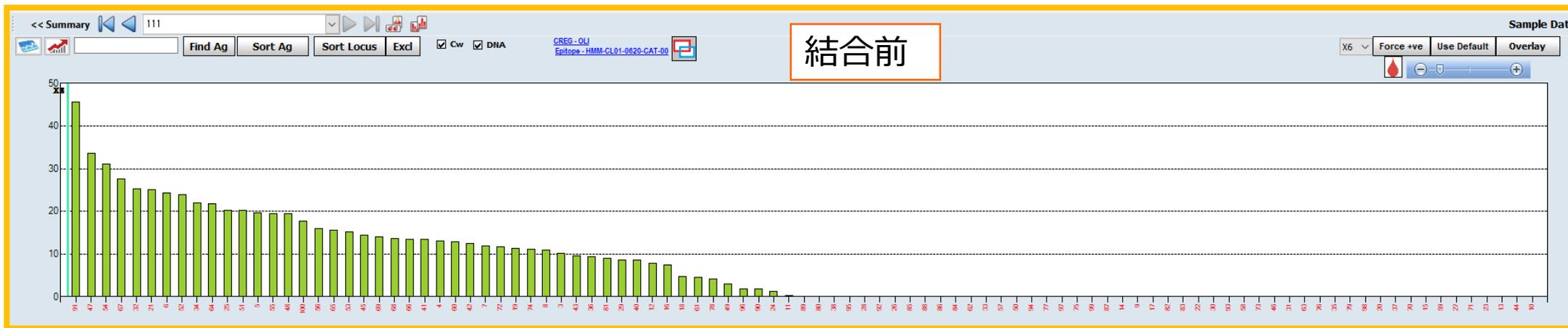
Select	Sample ID	Sample Date	Well Position	Session Name	Analysis Date	Final/Assign	W6-32	Quantplex	Sec Ab	Treatment
<input checked="" type="checkbox"/>	111		22(1,F3)	[redacted]			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

HLA Fusion™
The Rxn of LABScreen Supplemental and SA beads will be recomputed.
Please note that the combine Rxn pattern will not be saved.
OK

Analyze Cancel

別の画面が立ち上がるため結合するデータに☑を入れる
右下の「Analyze」をクリックし、メッセージ画面のOKをクリック

Single AntigenとSupplementのデータの結合



同一患者の別のデータを並べて見る

Sample IDまたはPatient IDが同一の他のセッションの結果がリスト表示

Sample	Sample Date	Patient ID	Session	Catalog ID	SecondaryAb	Treatment
FL1-PC		Patient 160	200908_LSM022_NC023-2_20200908_121005	LSM12NC2		
FL1-PC		Patient 160	200908_SA1011_NC023-1_20200908_121417	LS1A04NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_LS1A04011_NC023-1New_20200908_141854	LS1A04NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_LS1A04011_NC023-2New_20200908_142249	LS1A04NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_SA1011_NC023-2_20200908_121823	LS1A04NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_LS2A01013_NC023-1New_20200908_142611	LS2A01NC		
FL1-PC		Patient 160	014_200908_LS2A01013_NC023-1New_20200908_142611	LS2A01NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_LS2A01013_NC023-2New_20200908_142942	LS2A01NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_SA2013_NC023-1_20200908_122202	LS2A01NC		
FL1-PC		Patient 160	200908_SA2013_NC023-2_20200908_122537	LS2A01NC		
SH3102		Patient 160	20190515QCWS_PRA1017_NC020_20190515_122559	LS1PRANC		
SH3102		Patient 160	20190515QCWS_Mix021_NC020_20190515_122241	LSM12NC2		
SH3102		Patient 160	20190508_QCWS_LSM12021_NC020_20190508_152225	LSM12NC2		
SH3102		Patient 160	20190515QCWS_PRA2017_NC020_20190515_122901	LS2PRANC		
SH3102		Patient 160	20190515QCWS_SP1004_NC020_20190515_123944	LS1ASP01		
SH3102		Patient 160	20190515QCWS_SA1011_NC020_20190515_123219	LS1A04NC		

ダブルクリックすると2つの結果を並べて表示

Side by Side Compare for Sample: SH3102

4桁表示への変更

Analyze Data Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

- Update Reference
- Catalog Template Association
- Molecular Product Configuration
- Antibody Product Configuration
 - Create Combined Products
 - Set Default Negative Value
 - Set Mixed Product Configuration
 - Set Analysis Configuration
 - NS File Import
- General Settings
- Products Selection
- Validation
- Switch User
- Switch Database

Analysis Configuration Settings

HLA Fusion™

Antibody Product: MM

Product Type: LABScreen Single Antigen

Threshold: X Baseline

Low Bead Count *: 50 GREG *: OLI

Low NC Raw *: Low NC % *: Low PC *: Low PC/NC Ratio

Negative Sample Criteria

Normal Value of First Bead < 500

Normal Value of Third Bead < 300

Do Not Display Warning Messages

Swap Bead if NC is higher than all Beads

Swap Bead if NC is high

Swap Bead if Low NC

Set Max

Baseline: 10000 Ratio: 5 Raw: 10000

User Defined CutOff:

Exclude Patient Typing

Show DNA Mode

Use All Beads to Calculate Mean in Epitope Analysis

Use Active Formula for Match/Mismatch DSA Value

*: Required Field

Reset to Save Close

ONE LAMBDA

CREG - OLI
Epitope - HMM Class1 0817

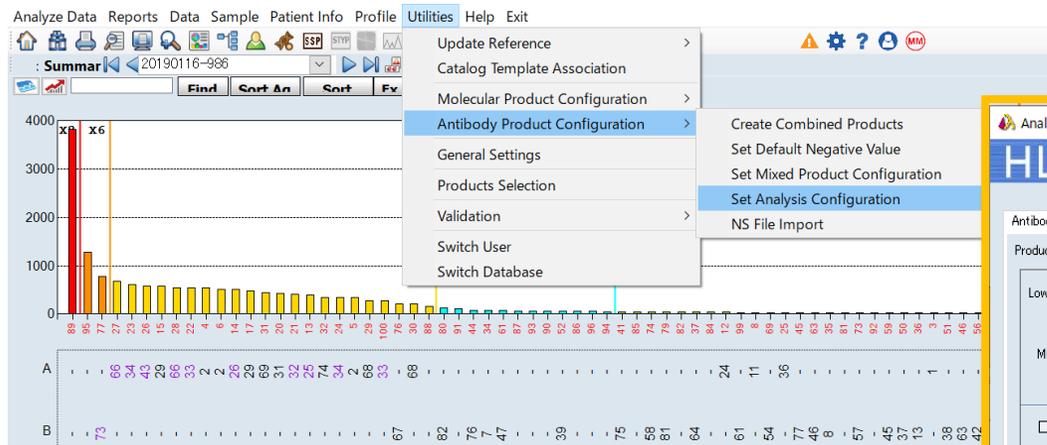
x8 x6 x2

D

手動で変更も可能

常に4桁表示となるよう設定

解析条件の設定



NC値やPC値などの再検査基準を変更することができます

Epitopeの表示



The screenshot shows the Epitope software interface. At the top, there are checkboxes for 'DQA/DPA' and 'DNA', and a dropdown menu for 'Epitope - HMM Class2 0817'. Below this, there are radio buttons for 'All', 'Ab Verified', and 'Other', and a dropdown for 'iCr3D Latest Version'. There are also checkboxes for 'DNA Mode' and 'Assign epitope when it is double clicked'. The main part of the interface is a table with columns for 'Group Name', 'AA Position', 'Polymorphic Residues', and several columns of HLA alleles. The alleles are color-coded: blue (e.g., DRB1*01:01), pink (e.g., DRB1*01:02), orange (e.g., DRB1*14:02), yellow (e.g., DRB1*04:05), and green (e.g., DRB1*04:03). The table also includes a 'D' column on the right side.

Group Name	AA Position	Polymorphic Residues											
70QRA	70QRA	70Q71R73A	DRB1*01:01	DRB1*01:02	DRB1*14:02	DRB1*04:04	DRB1*04:05	DRB1*04:03	DRB1*01:31	DRB1*01:32	DRB1*01:34	D	
96Y2	96Y2	96Y98E120N(180L181T)	DRB1*04:01	DRB1*04:04	DRB1*04:05	DRB1*04:03	DRB1*04:02	DRB1*04:10	DRB1*04:06	DRB1*04:92	DRB1*04:34	D	
13FEL	13FEL	13F14E26L	DRB1*01:01	DRB1*01:02	DRB1*10:01	DRB1*01:03	DRB1*01:28	DRB1*01:29	DRB1*01:30	DRB1*01:31	DRB1*01:32	D	
96ES2	96ES2	96E98K120S(28E30C31)	DRB1*01:01	DRB1*01:02	DRB1*01:03	DRB1*01:04	DRB1*12:17	DRB1*01:13	DRB1*01:20				
57A	57A	57A58A60H	DRB1*14:01	DRB1*14:54	DRB1*14:120	DRB1*14:122	DRB1*14:124	DRB1*14:125	DRB1*14:16	DRB1*14:26	DRB1*14:28	D	
111R	111R	111R	DPA1*02:01	DPA1*02:02									
74SR3	74SR3	71A75S77R(116I)(125S)	DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*05:04	DQB1*05:05	DQB1*05:06	DQB1*05:07	DQB1*05:08	DQB1*05:09	D	
55EA	55EA	55E56A57E	DPB1*05:01	DPB1*19:01	DPB1*47:01	DPB1*38:01	DPB1*36:01	DPB1*30:01	DPB1*24:01	DPB1*22:01	DPB1*21:01	D	
31Q	31Q	31Q	DPA1*02:01	DPA1*02:02	DPA1*01:06	DPA1*02:04							
125SQ	125SQ	125S126Q	DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*05:04	DQB1*05:05	DQB1*05:06	DQB1*05:07	DQB1*05:08	DQB1*05:09	D	
178M	178M												
56PS	55 57												
112V	112V												

青字：試薬に含まれるアレル

緑字：試薬に含まれないアレル

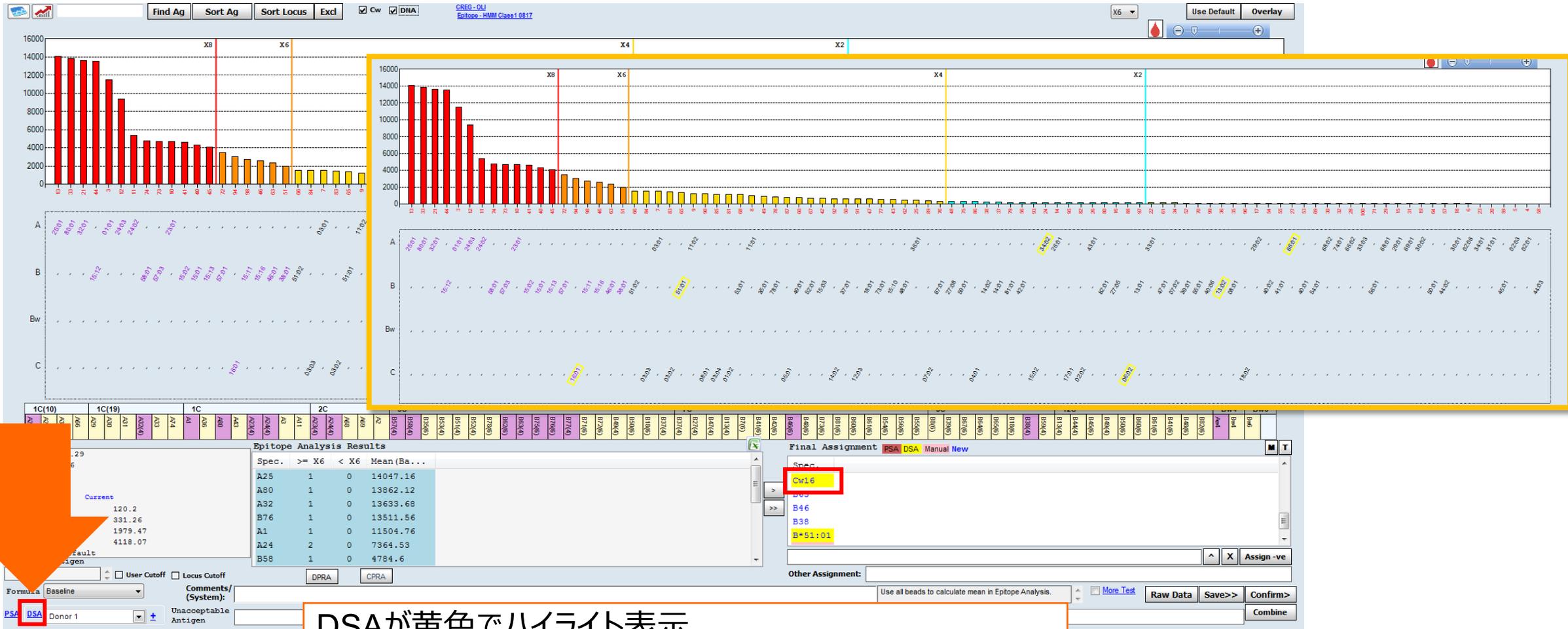
ピンクセル：陽性と判定したアレル

オレンジセル：陽性と判定したアレルと2桁レベルで同じアレル
(4桁アレルとしては試薬に含まれない)

黄色セル：ドナーのアレル(DSA)

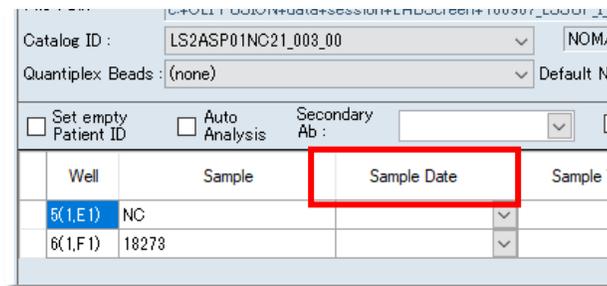
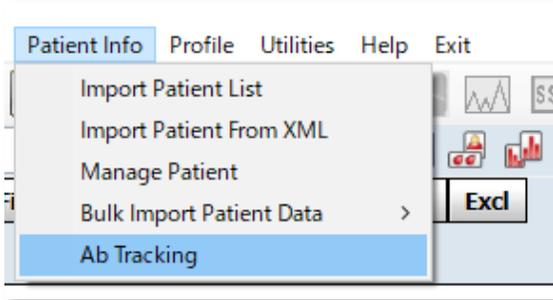
赤色セル：患者アレル(自己抗体)

DSAの表示

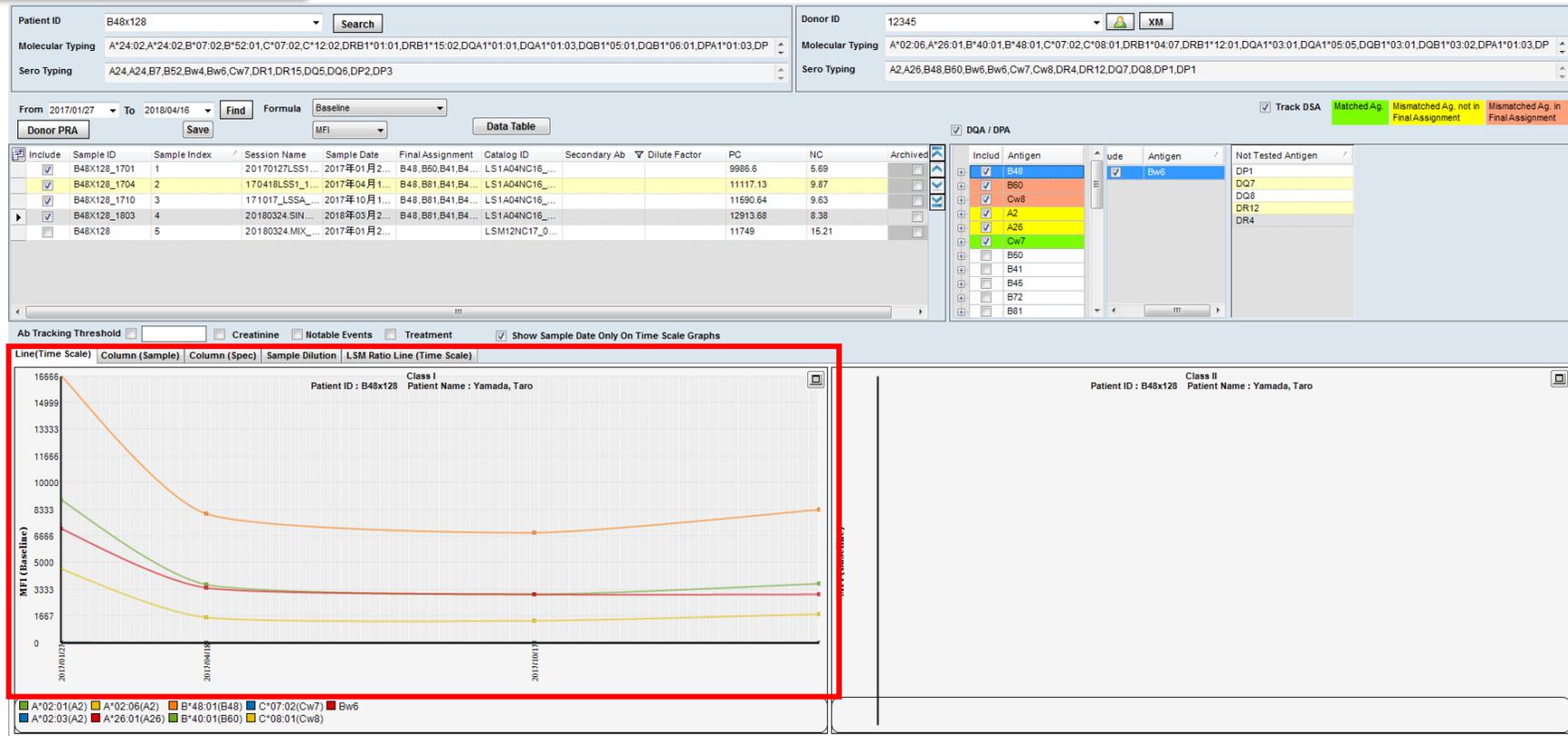


DSAが黄色でハイライト表示
(患者情報とドナー情報が登録されている場合のみ)

モニタリング



抗体検査結果の推移がグラフで表示される
データをインポートする際に「Sample Date」の
入力が必須





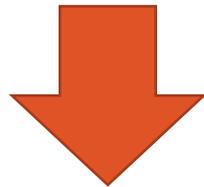
VERITAS

Veritas Corporation

検体の前処理

なぜ検体の前処理を行うのか

- LABScreenには検査成立基準が設定されている
 - MinBead Cnt: 50以上
 - NCビーズ: 1500以下
 - PCビーズ: 500以上
 - PC/NCRatio: 2以上



- NCビーズ、PCビーズを検査成立基準内の値にするために前処理を実施

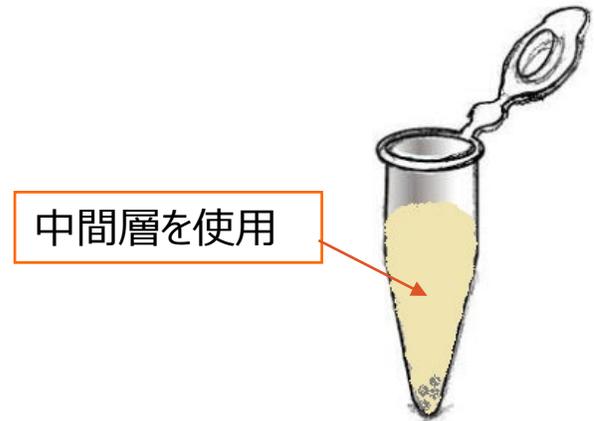
前処理の意義と種類

- NCビーズ
 - NBG RatioやnMFIの値の算出に使用されるため、できるだけ低くすることが大切
 - 抗HLA抗体以外の物質(非特異タンパク)の影響で高くなる
- PCビーズ
 - 低い場合は、本来存在する抗HLA抗体がビーズに結合していない可能性(偽陰性)がある
 - 補体活性が高いことやIgMが含まれることが原因で低くなる

方法 (赤字は必須)	目的	結果に与える影響
凍結融解 & 遠心、Adsorb Out、FBS、超高速遠心	非特異タンパクを取り除く	NCビーズの値を下げる
Presorb	非特異タンパクを取り除く	抗原ビーズの非特異反応を除去 NCビーズの値が下がる検体もある
EDTA	補体活性の影響を取り除く	PCビーズの値を上げる
DTT	IgMを取り除く	PCビーズの値を上げる

凍結融解→遠心(必ず行う)

- 背景
 - 患者血清・血漿中には不純物が含まれる
- プロトコール
 - 血清・血漿の凍結
 - 最短で-70℃以下、15分で凍結
 - 確実に凍結することが重要（推奨の温度や時間はない）
 - 解凍後遠心（8,000~10,000G、10分間以上）
 - 遠心後、中間層より検体を回収する
- 注意点
 - 高速回転の遠心機を使用するとなお良い
 - 不純物が多い検体は、遠心速度、時間を増やす



- 背景

- ラテックス抗体を吸着するビーズ試薬
- ラテックスに対する抗体はNCビーズに結合し、NCビーズの値が高くなることもある

- プロトコール

- Adsorb Outビーズをボルテックス
- 検体血清30 μ LにAdsorb Outビーズ3 μ L加えボルテックス
- 室温で30分間、振とうさせながらインキュベート
- 15,000 rpmで5分間遠心
- 上清を新しいチューブに回収
 - チューブ底のAdsorb Outビーズを吸わないように注意
 - 使用したビーズは再利用不可
 - Adsorb Outビーズが混入した場合は、再度遠心して上清を回収

Adsorb Outを複数回実施した結果

	Neat	1x ADS	2x ADS	3x ADS	4x ADS
NCビーズ	4451	804	579	538	471
PCビーズ	7516	5115	3508	3833	3935
PC/NC Ratio	1.7	6.4	6.1	7.1	8.4
抗体価の高いビーズ	19, 4, 18, 75, 91, 23, 69, 15	19, 4, 18, 75, 91, 23, 15, 81	19, 4, 75, 91, 23, 15, 81, 69	19, 4, 75, 91, 18, 23, 69, 17	19, 4, 75, 18, 91, 23, 69, 17

15番ビーズに反応するHLA抗体がAdsorb Outによって吸着され、陰性になった

データ：One Lambdaより

- 注意点

- 複数回行くと抗HLA抗体も吸着され抗体価が減少することがあるので注意（3回程度が限度）
- 70-80%の検体で有効であると考えられている
- 検体によって処理をすることでNCビーズが上がる場合もある(原因不明)

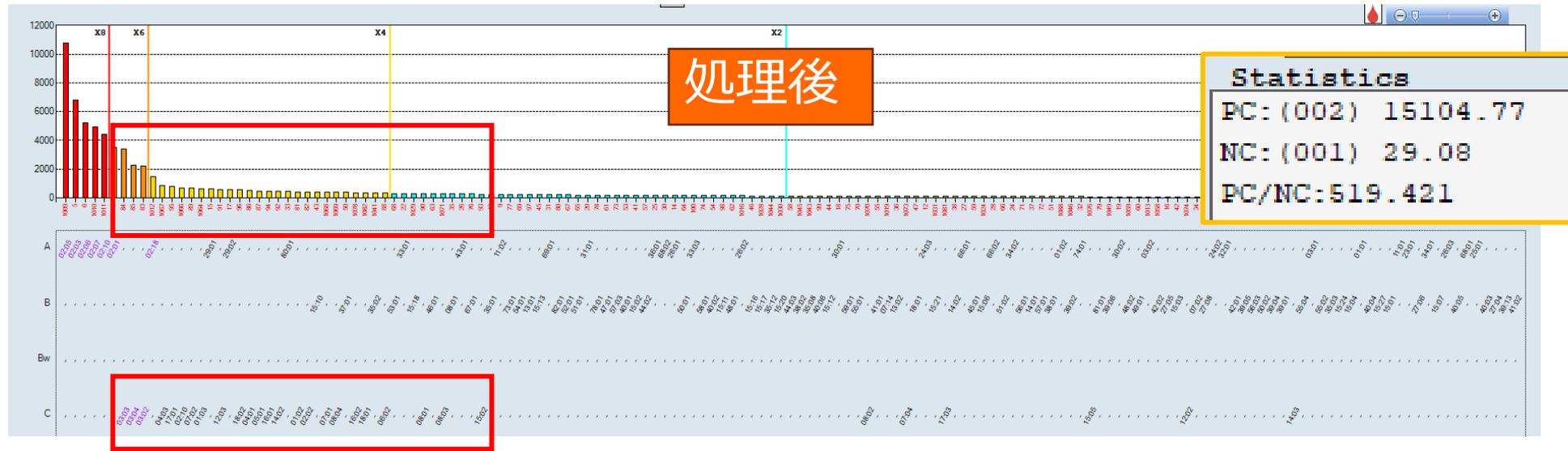
- 背景

- HLA抗原以外に対して産生された抗体を吸着する試薬

- プロトコール

- Presorbビーズをボルテックスし、25 μ Lをエッペンチューブに移す
- 8,000~10,000Gで1分間遠心
- 上清を除去し、検体血清25 μ L加える
- 1分間ボルテックスをした後に、室温で10分間反応
- 8,000~10,000Gで1分間遠心
- マグネットに1分間静置し、上清を採取

Presorbデータ例

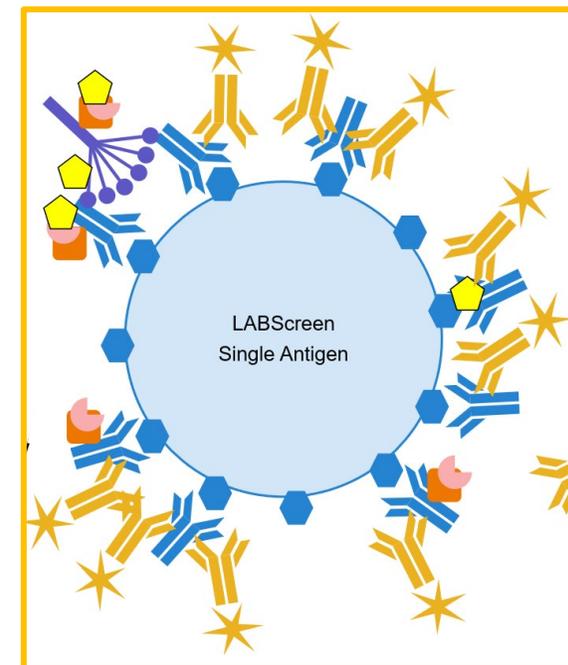
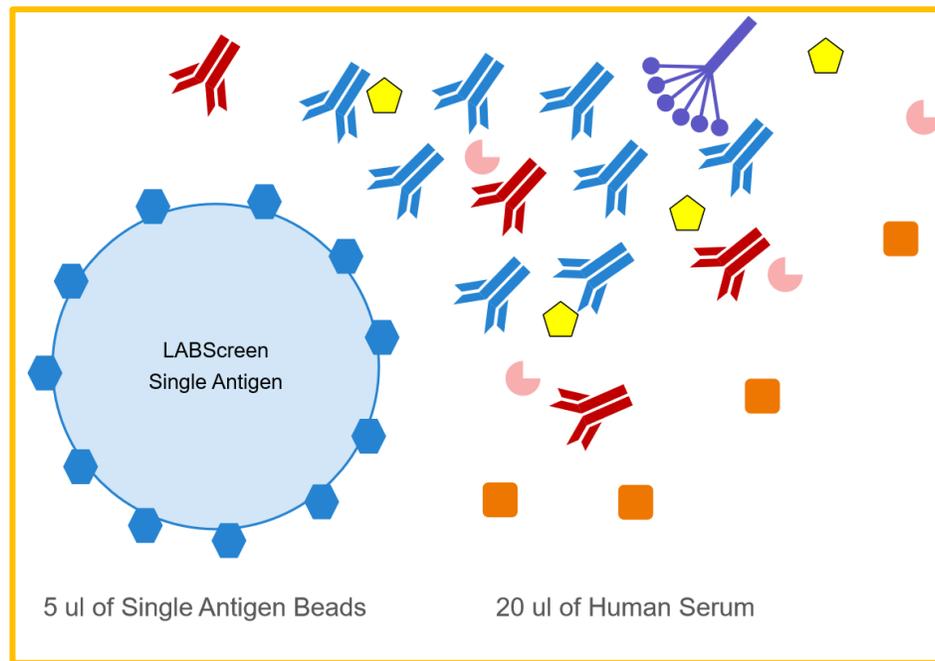


- 背景

- 検体中に過剰な補体が存在することで、二次抗体の反応が阻害され、偽陰性となる現象（プロゾン様現象）の影響を取り除く
- 補体活性経路に必要な Ca^{2+} をキレートすることで除去し、補体経路の活性化を抑える
- 新鮮血清の場合、補体活性が高い場合があるため注意が必要

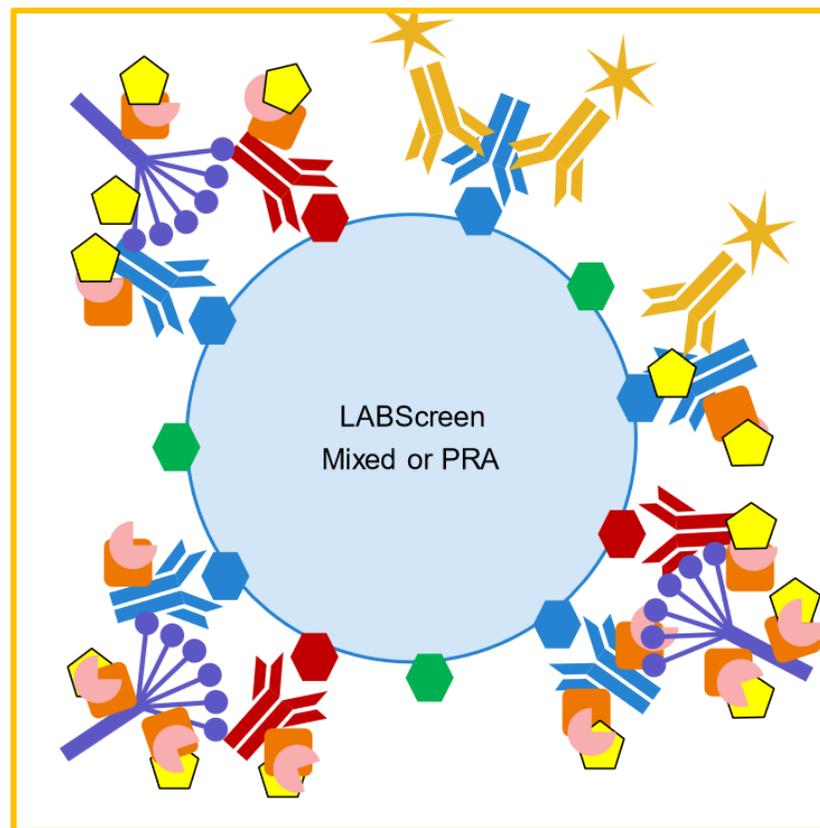
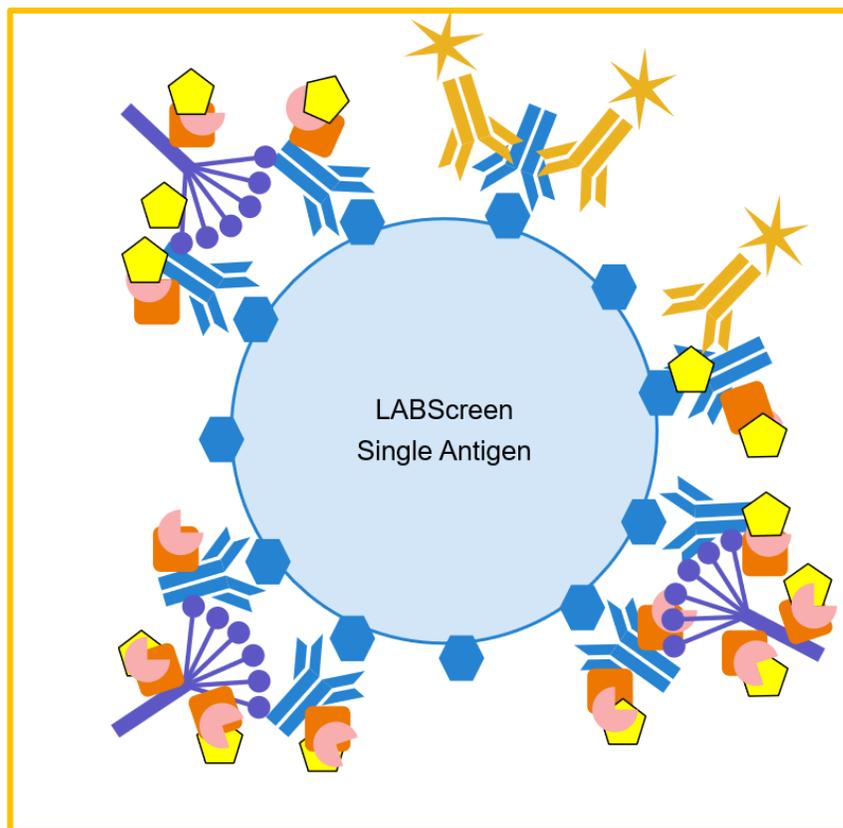
試薬と血清の反応(通常の反応)

- アイコンの説明
- HLA抗原
 - 抗HLA抗体
 - 非特異抗HLA抗体
 - 補体(C1q)
 - 補体(C4)
 - 補体(C2)
 - 補体(C3)
 - 二次抗体



補体活性が低い場合は、二次抗体が抗HLA抗体に結合できるので、nMFIの値に影響を与えない

試薬と血清の反応(補体活性が高い場合)

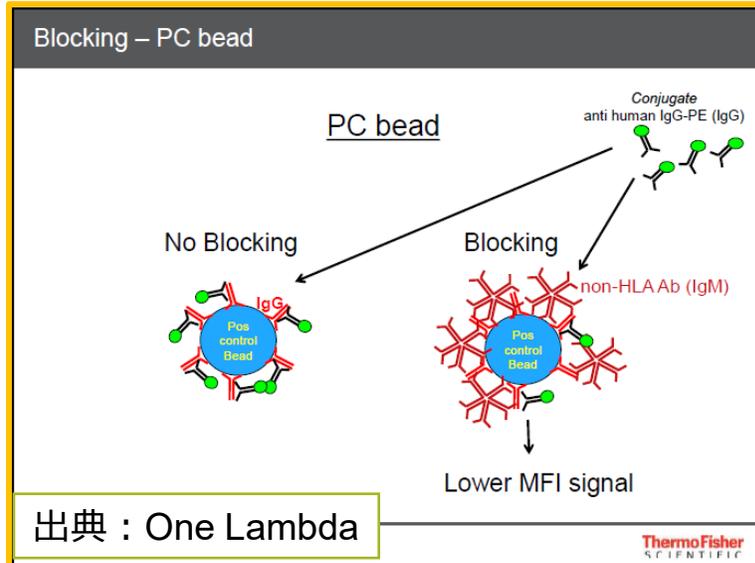


補体が抗HLA抗体に結合するため、二次抗体が結合できなくなる
→nMFIの値が下がる (偽陰性となる可能性がある)

- 血清90 μ Lに0.5M EDTA(メーカー不問)2 μ L添加
 - 検体内のEDTA濃度を約10 mMとなるように調整する
 - 溶液状態のEDTAの利用を推奨
- 室温で10分間振とうしながら反応させる
- 20,000Gで10分間遠心、上清を使用
 - 参考資料
 - HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect (*Transplantation* 2011;92: 510–515)
- 測定結果からプロゾーン様現象が起こっているか否かは判断できない
 - 前処理を行い測定結果に変化が見られればプロゾーン様現象が起こっていたことがわかる

• 背景

- IgM抗体が存在するとIgG抗体の結合を阻害することがある
- IgMの5量体のジスルフィド結合を還元することで切断し不活化する



ビーズに5量体のIgM抗体が結合すると
二次抗体(IgG)が結合できない
→偽陰性になる可能性がある

• プロトコール

- 血清90 μ L にDTT溶液 (0.05M) 10 μ Lを添加 (DTT終濃度: 0.005M)
- よく混合し、37°Cで30-45分インキュベート
- 8,000~10,000G、10分間遠心

出典: ASHI LABORATORY MAMUAL Fourth Edition

- 目的
 - 非特異反応の原因タンパクの除去
- プロトコール
 - 検体血清100 μ Lに対し、非動化したFBSを3 μ L添加
 - 37°C、20-30分間インキュベート
 - 10,000Gで20分間遠心
 - 中間層の血清を別のチューブに回収
- 参考資料
 - Charlene Breitenbach, Laesha Kaelin, Pamela Chapman, *et al.* Pretreatment of Patient Serum with Fetal Bovine Serum (FBS) Reduces Non-Specific Background and Enhances HLA Antibody Detection in Bead and Cell Based Assays. *Human Immunology*, Vol **74**, November 2013, page 57.

- 検体をPBS等で希釈することにより、非特異反応やプロゾーン様現象を回避する
- 方法
 - PBSを用いて希釈
 - 希釈倍率の指定はない

- 背景
 - 特にバックグラウンドの高い検体を超高速遠心することで、検体の非特異タンパクを除去
- 方法
 - 100,000G、15-20分間遠心
 - 上清を回収
- 注意点
 - 超高速遠心機がない場合は、遠心時間を長くする等の方法を検討する

- 前処理の原理の理解をしたうえで、各施設で実施基準の設定を
- どのような前処理を行ってもバックグラウンドを取り除くことができない検体も存在する

ご清聴ありがとうございました。
ご質問はございますでしょうか。

