

## GEBRAUCHSINFORMATION

# HISTO TRAY HLA Klasse I

CE<sub>0123</sub>

## IN VITRO DIAGNOSTIKA

### Produktbeschreibung

Bei **HISTO TRAY** handelt es sich um Mikrotestplatten mit vorgetropften Anti-HLA-Seren und Kontrollen zur Gewebetypisierung der HLA-Klasse I Antigene. Kaninchenkomplement, Worksheets zur Auswertung und Ergebnislisten sind beigelegt.

### Testprinzip

Anti-HLA-Seren reagieren mit korrespondierenden, membrangebundenen Antigenen von humanen Lymphozyten. Der Zusatz von Kaninchenkomplement führt zu Strukturveränderungen der Zellmembran, so dass ein Indikatorfarbstoff in die Lymphozyten eindringen kann und diese anfärbt (positive Reaktion). Findet keine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, bleibt die Zellmembran intakt. Die Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen (negative Reaktion).

### Testdurchführung - Isolierung von Lymphozyten aus z.B. heparinisierem Blut

1. Zur Steigerung der Zellausbeute 4 ml heparinisieretes (50 IE/ml) Blut mit 4 ml Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, verdünnen.
2. 4 - 5 ml Zelltrennmedium, z.B. HISTOPREP, in ein Zentrifugenröhrchen (12 ml) geben.
3. Ca. 6 ml verdünntes Blut mit einer Pasteurpipette am Innenrand des Röhrchens vorsichtig auf den Gradienten schichten.
4. 15 Minuten bei 1.200 x g und einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) zentrifugieren. Zentrifuge ungebremst auslaufen lassen.
5. Mit einer Pasteurpipette den Lymphozytenring (Interphase) abheben und in ein neues Zentrifugenröhrchen geben.
6. Zum Waschen der Lymphozyten mit Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, auffüllen und 10 Minuten bei 550 x g zentrifugieren; Überstand verwerfen; Sediment resuspendieren und mit Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, auffüllen.
7. 10 Minuten bei 230 x g zentrifugieren; Überstand verwerfen, Sediment resuspendieren und mit Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, auffüllen.
8. Nochmals 10 Minuten bei 110 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
9. Sediment in Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, so resuspendieren, dass eine Endkonzentration von 2000 - 3000 Lymphozyten pro µl vorliegt (Neubauer-Zählkammer oder Zellcounter).

### Testdurchführung NIH-Test

1. HISTO TRAY-Platten auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
2. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl Lymphozytensuspension (2.000 - 3.000 Zellen) geben.  
Um eine korrekte Antigen-Antikörperreaktion zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich Zellen und Antiserum verbinden.
3. 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
4. 5 - 6 µl Kaninchenkomplement zugeben.
5. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
6. 3 - 4 µl Eosin-Lösung (5% wässrig) (Softtouchmethode) zugeben und 5 - 10 Minuten inkubieren.
7. Mit 5 - 6 µl Formaldehyd-Lösung (37%; pH 7,2) fixieren (Softtouchmethode) und mindestens 60 Minuten stehenlassen.
8. Zur besseren Beurteilung kurz vor dem Mikroskopieren ein Deckgläschen auflegen und mit inversem Phasenkontrastmikroskop auswerten.

### Testdurchführung - Isolierung von T-Lymphozyten mit Immunobeads-Technik

Die Isolierung der T-Lymphozyten mit der Immuno-Beads-Technik und die zur Färbung und Fixation benötigten Reagenzien sind den Gebrauchsinformationen des Herstellers zu entnehmen.

### Testdurchführung - Immuno-Beads-Technik (IMB)

1. HISTO TRAY-Platten auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
2. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl IMB-T-Lymphozytensuspension (ca. 1.000 Zellen) geben.  
Um eine korrekte Antigen-Antikörperreaktion zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich Zellen und Antiserum verbinden.
3. 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
4. 5 µl Kaninchenkomplement Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) zugeben (1.000 µl Kaninchenkomplement + 20 µl AO/EB).
5. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) im Dunkeln inkubieren.
6. 5 µl EDTA-/Quenching-Lösung zugeben (2.000 µl Quenching-Lösung + 1.000 µl EDTA 8% wässrig).
7. Unter einem Fluoreszenzmikroskop ablesen.

### Bewertung der Reaktionen

Der Anteil der lysierten Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl wird als Scorewert angegeben.

| % lysierte Zellen |   | Score   | Bewertung        |
|-------------------|---|---------|------------------|
| 0 - 19%           | = | Score 1 | negativ          |
| 20 - 39%          | = | Score 2 | fraglich negativ |
| 40 - 59%          | = | Score 4 | schwach positiv  |
| 60 - 79%          | = | Score 6 | positiv          |
| 80 - 100%         | = | Score 8 | stark positiv    |
|                   | = | Score 0 | nicht auswertbar |

### Fehlerquellen

#### **Ursache falsch negativer oder schwacher Reaktionen**

- Erythrozyten können das Ablesen erschweren
- Kontamination mit Thrombozyten
- Zu hohe Lymphozytenzahl
- Gelbfärbung der Anti-HLA-Seren
- Platten aufgetaut und wieder eingefroren
- Komplement vor Verwendung zu lange bei Raumtemperatur gelagert
- Reste von aufgelöstem Komplement eingefroren und erneut verwendet
- Zu kurze Inkubationszeiten
- Zu niedrige Inkubationstemperatur

**Ursache falsch positiver Reaktionen**

- Kreuzreaktionen
- Zu lange Inkubationszeiten
- Zu hohe Inkubationstemperatur
- Vorgeschiedigte Lymphozyten (Negativkontrolle ist positiv = „background“)
- Reaktionen wurden nicht abgestoppt

**Kaninchenkomplement**

Lyophilisiertes Kaninchenkomplement kurz vor Gebrauch mit 1 bzw. 5 ml (siehe Packungsgröße) Aqua dest. rehydrieren. Die Rehydrierung dauert 10 - 15 Minuten.

Aufgelöstes Kaninchenkomplement muss kühl (2...8°C) gelagert und innerhalb von 3 - 4 Stunden verbraucht werden.

**Aufgelöstes Kaninchenkomplement NICHT EINFRIEREN!**

**Leistungsdaten**

Diagnostische Sensitivität und Spezifität (R-Wert) sind den Ergebnislisten HISTO TRAY zu entnehmen.

**Literatur**

Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens 49:297-321

**Warn- und Entsorgungshinweise**

**HISTO TRAY-Platten und Kaninchenkomplement** sind nur für den in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollten nur von geschultem, in Histokompatibilitätstestung erfahrenem Fachpersonal angewendet werden. Transfusionsrichtlinien und EFI- / DGI-Standards sind zu beachten, insbesondere bei zweifelhaften Typisierungsergebnissen.

Humanes Ausgangsmaterial für die Produktion der Testreagenzien wurde auf HBsAg und Antikörper gegen HIV und HCV getestet. Nur negatives Material wurde für die Produktion verwendet. Trotzdem sollten sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, wie Blut, Serumproben und Kontrollseren als potentiell infektiös betrachtet werden, da keine Testmethode alle infektiösen Krankheitserreger nachweisen kann. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Anti-HLA-Seren enthalten NaN<sub>3</sub> als Konservierungsmittel. Die in den Reagenzien enthaltene Konzentration von < 0,1% NaN<sub>3</sub> gilt nicht als gesundheitsschädlich, trotzdem sollte ein Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten vermieden werden. Kupfer und Blei, die in einigen Rohrsystemen eingesetzt werden, können mit Azid explosive Salze bilden. Die in den Reagenzien enthaltenen Azidmengen sind klein, trotzdem sollte bei der Beseitigung von Azid-haltigem Material mit reichlich Wasser nachgespült werden.

Die Entsorgung aller Proben und Testmaterialien sollte entsprechend der gesetzlichen Richtlinien erfolgen.

Für die Quenching-Lösung, Formaldehyd-Lösung und Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) sollten die Warn- und Entsorgungshinweise des Herstellers befolgt werden.

Eine gelbe Verfärbung der Anti-HLA-Seren, die auch nach dem Auftauen bestehen bleibt, zeigt eine Änderung im pH-Wert an. Derartige Platten sollten **nicht** für den Test eingesetzt werden.

Sicherheitsdatenblätter auf Anfrage erhältlich.

**HISTO TRAY-Platten und Kaninchenkomplement** nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen.

**Konservierungsmittel:**

< 0,1% NaN<sub>3</sub>

**Haltbarkeit:**





bis zum aufgedruckten Datum auf den Etiketten

**Lagerung:**

≤ -20°C

**Packungsgröße / Typisierungen:**

gemäß Angaben auf dem Kit

| Erklärung der Symbole auf den Etiketten   |                                  |   |  |
|---|----------------------------------|---|--|
|  | verwendbar bis                   |  | Gebrauchsinformation beachten                              |
|  | Lagertemperatur                  |  | ausreichend für n Tests                                    |
| <b>ANTI-HLA-SERA</b>  | Anti-HLA-Seren                   | <b>LOT</b>  | Lot-Nummer   |
| <b>COMPLEMENT RAB</b>   | Kaninchenkomplement              | <b>LYOPH</b>  | lyophilisiert  |
| <b>CONT</b>   | Inhalt, enthält                  | <b>MICROTESTTRAY</b>  | Mikrotestkammer mit vorgetropften Antiseren und Kontrollen |
| <b>CONTROL -</b>  | Negative Kontrolle               | <b>MONOCL</b>   | monoklonal   |
| <b>CONTROL +</b>  | Positive Kontrolle               | <b>OR</b>   | oder   |
| <b>HLA TYPING</b>   | Zweckbestimmung: HLA-Typisierung | <b>POLYCL</b>   | polyklonal   |
| <b>HUM</b>  | Ursprung: human                  | <b>REF</b>  | Bestell-Nummer   |
| <b>IFU</b>  | Gebrauchsinformation             | <b>WORKSHEET</b>  | Auswertungsbogen   |
| <b>IVD</b>  | In-vitro-Diagnostikum            |   |  |

**Version 1/2012**



**BAG Health Care GmbH**

Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49(0) 6404/925-0  
Fax: +49(0) 6404/925-250

www.bag-healthcare.com  
info@bag-healthcare.com

**Auftragsannahme/Ordering:**

Tel.: +49(0) 6404/925-450  
Fax: +49(0) 6404/925-460  
verkauf@bag-healthcare.com

**Customer Service:**

Tel.: +49(0) 6404/925-125  
Fax: +49(0) 6404/925-421  
service@bag-healthcare.com

## INSTRUCTIONS FOR USE

# HISTO TRAY HLA Class I



## FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

### Description of product

The intended use of HISTO TRAY is the tissue typing of HLA class I antigens using microplates with predropped anti-HLA sera and controls. Rabbit complement, worksheets for evaluation and the listing of test results are enclosed.

### Test principle

HLA-antisera react with the correspondent membrane-bound antigens on human lymphocytes. The addition of rabbit complement results in a structural change of the cell membrane which leads to a penetration of an indicator dye. Stained lymphocytes = positive reaction. In case of missing antigen-antibody reaction, the cell membrane is intact. No penetration of indicator dye takes place and the cells remain unstained = negative reaction.

### Test procedure - Isolation of lymphocytes from e.g. heparinized blood

1. In order to increase the cell yield, dilute 4 ml of heparinized blood (50 I.U./ml) with 4 ml of cell culture medium (e.g. RPMI 1640).
2. Pipet 4 - 5 ml of cell separation medium, e.g. HISTOPREP, into a centrifuge tube (12 ml).
3. Carefully add app. 6 ml of diluted blood with a Pasteur pipette to the gradient alongside the inner edge of the tube.
4. Centrifuge 15 minutes at 1200 x g and a temperature of 18...22°C (room temperature). Centrifuge without braking.
5. Take off the lymphocyte ring (interphase) using a Pasteur pipette and pipet it into a new centrifuge tube.
6. For lymphocyte washing, fill it up with cell culture medium, e.g. RPMI 1640, and centrifuge for 10 minutes at 550 x g. Discard the supernatant, resuspend the sediment and fill it up with cell culture medium, e.g. RPMI 1640.
7. Centrifuge for 10 minutes at 230 x g, discard the supernatant, resuspend the bottom sediment and fill it up with cell culture medium, e.g. RPMI 1640.
8. Centrifuge for 10 minutes at 110 x g and discard the supernatant.
9. Resuspend the sediment in cell culture medium, e.g. RPMI 1640, and adjust to a final concentration of 2000 - 3000 lymphocytes per µl (Neubauer count chamber or cell counter).

### Test procedure – NIH technique

1. Bring the HISTO TRAY plates to a temperature of 18...22°C (room temperature).
2. Place 1 µl lymphocyte suspension (2.000 - 3.000 cells) into each predropped well.  
In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
3. Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 30 minutes.
4. Add 5 - 6 µl rabbit complement.
5. Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 60 minutes.
6. Add 3 - 4 µl Eosin solution (5% aqueous) (soft touch method) and incubate for 5 - 10 minutes.
7. Fix with 5 - 6 µl Formaldehyde solution (37%, pH 7.2) (soft touch method). Allow sedimentation of cells at least 60 minutes.
8. Cover the tray with a cover glass shortly before reading under an inverse phase contrast microscope.

### Test procedure - Isolation of T-lymphocytes from e.g. heparinized blood

Isolation of the T-lymphocytes using the Immuno Beads method as well as staining and fixation reagents according to manufacturer instructions.

### Test procedure - Immuno Beads (IMB) method

1. Bring the HISTO TRAY plates to a temperature of 18...22°C (room temperature).
2. Place 1 µl IMB-T-lymphocyte suspension (app.1.000 cells) into each predropped well.  
In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
3. Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 30 minutes.
4. Add 5 µl rabbit complement Acridinorange/Ethidiumbromide (AO/EB) (1.000 µl rabbit complement + 20 µl AO/EB).
5. Incubate for 60 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature) in darkness.
6. Add 5 µl EDTA-/quenching-solution (2.000 µl quenching solution + 1.000 µl EDTA 8% aqueous).
7. Read HISTO TRAY plates under a fluorescence microscope.

### Evaluation of results

The amount of lysed lymphocytes compared with the total amount of lymphocytes is quoted as a score value in each well.

| % lysed cells |   | Score   | Evaluation             |
|---------------|---|---------|------------------------|
| 0 - 19%       | = | Score 1 | negative               |
| 20 - 39%      | = | Score 2 | doubtful negative      |
| 40 - 59%      | = | Score 4 | weak positive          |
| 60 - 79%      | = | Score 6 | positive               |
| 80 - 100%     | = | Score 8 | strong positive        |
|               | = | Score 0 | no evaluation possible |

### Troubleshooting

#### **Causes of false negative or weak reactions**

- Erythrocyte contamination can make microscopic evaluation difficult
- Platelet contamination
- The amount of lymphocytes is too high
- Yellow colour of the HLA antisera
- Trays have been thawed and refrozen
- Reconstituted complement kept too long at room temperature before use
- Residual complement was frozen and thawed again.
- Incubation times were too short
- Incubation temperature were too low

### Causes of false positive reactions

- Cross reactions
- Incubation times were too long
- Incubation temperature were too high
- Prior damage of lymphocytes (negative control is positive = „background“)
- Failure to add fixative

### Rabbit Complement

Reconstitute lyophilized complement with 1 ml or 5 ml aqua dest. (according to package sizes). The reconstitution takes 10 - 15 minutes. Reconstituted complement must be stored cool (2...8°C) and used within 3 - 4 hours.

**DO NOT FREEZE** dissolved rabbit complement!

### Performance characteristics

Please note the listing of test results HISTO TRAY in order to receive data for diagnostic sensitivity and specificity (R-Value)

### Literature

Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens 49:297-321

### Warnings and Precautions

**HISTO TRAY plates and rabbit complement** are designed for in vitro diagnostic use only and should be applied by properly trained personnel, experienced in histocompatibility testing. Transplantation guidelines as well as EFl standard should be followed, in the particular case of doubtful typing results. Human source material used to produce these reagents has been tested and found negative for HBsAg and HIV and HCV antibodies. Nevertheless all used biological material like blood, sera and control sera should be handled as potentially infectious, because no test method can guarantee that material derived from biological sources are free from infectious agents. When handling biological material appropriate safety precautions are recommended (Do not pipet by mouth; wear disposable gloves while handling biological material and performing the test; disinfect hands when finished the test).

Biological material should be inactivated before disposal (e.g. in an autoclave). Disposables should be autoclaved or incinerated after use. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated areas swabbed with a suitable standard disinfectant or 70% alcohol. Material used to clean spills, including gloves, should be inactivated before disposal (e.g. in an autoclave).

Anti-HLA sera contain  $\text{NaN}_3$  as a preservative. The reagents contain < 0.1%  $\text{NaN}_3$  which is not considered to be a harmful concentration. Nevertheless avoid contact with the skin and mucous membranes. The copper and lead used in some plumbing systems can react with azides to form explosive salts. The quantities of azide used in this reagents are small; nevertheless when disposing of azide-containing materials, they should be flushed away with a large volume of water.

Disposal of all specimen and test materials should be in accordance with state and local law.





For quenching solution, Formaldehyde solution and Acridinorange / Ethidiumbromide (AO/EB) please note the warnings and precautions of the manufacturer.

A yellow colouration of anti-HLA sera which still remains after thawing, may indicate a change of the pH value. Those plates should **not** be used for the test.

Material Safety Data Sheets available on request

Do not use **HISTO TRAY plates and rabbit complement** beyond the indicated expiration date on the label.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Preservative:</b>      | < 0.1% $\text{NaN}_3$                             |
| <b>Storage:</b>           | $\leq -20^\circ\text{C}$                          |
| <b>Shelf life:</b>        | until the expiration date indicated on the labels |
| <b>Package / typings:</b> | according to information indicated on the kit     |

| Explanation of symbols used on Labelling  |                              |   |  |
|---|------------------------------|---|--|
|  | use by                       |  | Consult Instructions for use                         |
|  | Storage temperature          |  | sufficient for n tests                               |
| <b>ANTI-HLA-SERA</b>  | anti-HLA-Sera                | <b>LOT</b>  | Batch code   |
| <b>COMPLEMENT RAB</b>   | rabbit complement            | <b>LYOPH</b>  | lyophilised  |
| <b>CONT</b>   | content, contains            | <b>MICROTESTTRAY</b>  | Microtest tray with predropped antisera and controls |
| <b>CONTROL -</b>  | negative Control             | <b>MONOCL</b>   | monoclonal   |
| <b>CONTROL +</b>  | positive Control             | <b>OR</b>   | or   |
| <b>HLA TYPING</b>   | Intended purpose: HLA-typing | <b>POLYCL</b>   | polyclonal   |
| <b>HUM</b>  | Origin: human                | <b>REF</b>  | Catalogue number                                     |
| <b>IFU</b>  | Instructions for use         | <b>WORKSHEET</b>  | Worksheet  |
| <b>IVD</b>  | For in vitro diagnostic use  |   |  |

**Version 1/2012**



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49(0) 6404/925-0  
Fax: +49(0) 6404/925-250

www.bag-healthcare.com  
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49(0) 6404/925-450  
Fax: +49(0) 6404/925-460  
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:

Tel.: +49(0) 6404/925-125  
Fax: +49(0) 6404/925-421  
service@bag-healthcare.com