

DE**GEBRAUCHSINFORMATION****HISTO TRAY
HLA Klasse II****HISTO TRAY DR 72 (10) REF 7029****Produktbeschreibung**

HISTO TRAY DR 72 enthält Mikrottestplatten mit vorgetropften Anti-HLA-Seren und Kontrollen. Kaninchenkomplement, Worksheets zur Auswertung und Ergebnislisten sind beigelegt. **HISTO TRAY DR 72** dient zur serologischen Gewebetypisierung der HLA-Klasse II Antigene.

Testprinzip

Anti-HLA-Seren reagieren mit korrespondierenden, membrangebundenen Antigenen von humanen Lymphozyten. Der Zusatz von Kaninchenkomplement führt zu Strukturveränderungen der Zellmembran, sodass 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 B-Lymphozyten aus z.B. heparinisiertem Blut

Die Isolierung der B-Lymphozyten mit der Immunobeads (IMB)-Technik oder der Immunorosettierungsmethode und die zur Färbung und Fixation benötigten Reagenzien sind den Gebrauchsinformationen des Herstellers zu entnehmen.

Testdurchführung

1. Zellisolierung mit der IMB-Technik oder Immunorosettierungsmethode.
2. HISTO TRAY-Platten auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
3. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl B-Lymphozytensuspension geben.
(ca. 1.000 Zellen bei Isolierung mit der IMB-Technik, ca. 1000 – 2000 Zellen bei der Isolierung mit der Immunorosettierungsmethode)
Um eine korrekte Antigen-Antikörperreaktion zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich Zellen und Antiserum verbinden.
4. Bei Isolation mit der IMB-Technik: 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
Bei Isolation mit der Immunorosettierungsmethode: 45 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
5. 5 µl Kaninchenkomplement Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) zugeben (1.000 µl Kaninchenkomplement + 20 µl AO/EB).
6. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) im Dunkeln inkubieren.
7. 5 µl EDTA-/Quenching-Lösung zugeben (2.000 µl Quenching-Lösung + 1.000 µl EDTA 8% wässrig).
8. HISTO TRAY-Platten unter einem Fluoreszenzmikroskop ablesen.

Bewertung der Reaktionen

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

% lysierte Zellen	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 Inkubationstemperaturen

Ursache falsch positiver Reaktionen

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

Kaninchenkomplement

Lyophilisiertes Kaninchenkomplement kurz vor Gebrauch mit 1 ml Aqua dest. auflösen. 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).

Die Anti-HLA-Seren enthalten < 0,1% NaN₃ als Konservierungsmittel. In der Konzentration von < 0,1% gilt NaN₃ nicht mehr 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 im Reagenz 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 und Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) sollten die Warn- und Entsorgungshinweise der Hersteller 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.

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

Konservierungsmittel: < 0,1% NaN₃

Haltbarkeit: bis zum aufgedruckten Datum auf den Etiketten

Lagerung: ≤ -20°C

Packungsgröße: gemäß Angaben auf dem Kit

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

Version 3/2016 | Stand: 2016-08



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

EN

INSTRUCTIONS FOR USE

HISTO TRAY HLA Class II



HISTO TRAY DR 72 (10) **REF** 7029

Description of Product

HISTO TRAY DR 72 contains microplates with predropped anti-HLA sera and controls. Rabbit complement, worksheets for evaluation and the listing of test results are enclosed. The intended use of **HISTO TRAY DR 72** is the serological tissue typing of HLA class II antigens.

Test Principle

HLA-antisera react with the corresponding 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 B-Lymphocytes from e.g. Heparinized Blood

Please refer to the manufacturer's instructions

- when using the Immunobeads (IMB) technique or Immunorosettes method for isolation of the B-lymphocytes
- regarding the reagents needed for staining and fixation

Test Procedure

1. Isolate cells with IMB technique or Immunorosettes method.
2. Bring the HISTO TRAY plates to a temperature of 18...22°C (room temperature).
3. Place 1 µl B-lymphocyte suspension into each predropped well.
Approximately 1000 cells if IMB technique was used for isolation, approximately 1000 – 2000 cells if Immunorosettes method was used for isolation.
In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
4. Isolation with IMB technique: Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 30 minutes.
Isolation with Immunorosettes method: Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 45 minutes.
5. Add 5 µl rabbit complement Acridinorange/Ethidiumbromide (AO/EB) (1.000 µl rabbit complement + 20 µl AO/EB).
6. Incubate for 60 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature) in darkness.
7. Add 5 µl EDTA-/quenching-solution (2.000 µl quenching solution + 1.000 µl EDTA 8% aqueous).
8. 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		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	evaluation not 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 temperatures were too low

Causes of false positive reactions

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

Rabbit Complement

Dissolve lyophilized complement with 1 ml aqua dest.. 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 refer to the listing of HISTO TRAY test results 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 EFI standard should be followed, especially in the particular case of doubtful 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 as preservative < 0.1% NaN₃. A concentration of < 0.1% NaN₃ 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 reagent 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 and Acridinorange/Ethidiumbromide (AO/EB) please adhere to the warnings and precautions of the manufacturers.

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

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

Preservative: < 0.1% NaN₃

Storage: ≤-20°C

Shelf life: until the expiration date indicated on the labels

Package: 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
ANTI-HLA-SERA	anti-HLA-Sera	LOT	Batch code
COMPLEMENT RAB	rabbit complement	LYOPH	lyophilised
CONT	content, contains	MICROTESTTRAY	Microtest tray with predropped antisera and controls
CONTROL -	negative Control	MONOCL	monoclonal
CONTROL +	positive Control	OR	or
HLA TYPING	Intended purpose: HLA-typing	POLYCL	polyclonal
HUM	Origin: human	REF	Catalogue number
IFU	Instructions for use	WORKSHEET	Worksheet
IVD	For in vitro diagnostic use		

Version: 3 / 2016 | Issue: 2016-08



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