

GEBRAUCHSINFORMATION

Anti-HLA Negative Control Anti-HLA Positive Control Anti-HLA Positive Control B-Cell Anti-HLA Positive Control T-Cell



Mikrolymphozytotoxizitätstest (NIH)

IN VITRO DIAGNOSTIKA

Produktbeschreibung

Anti-HLA Positive Control besteht aus Anti-Human-Lymphozytenglobulin (IgG) vom Kaninchen gepoolt mit polyspezifischen humanen HLA-Antisera.

Anti-HLA Negative Control besteht aus einem Serumpool von Spendern der Blutgruppe AB, welcher keine HLA-Antikörper aufweist.

Anti-HLA Positive Control und Anti-HLA Negative Control werden als Kontrollseren für die Gewebetypisierung der HLA-Klasse I- und/oder Klasse II- Antigene bzw. der HLA Antikörper im Mikrolymphozytotoxizitätstest verwendet.

Anti-HLA Positive Control B-Cell und T-Cell werden für die Überprüfung der Reinheit der isolierten B- / T- Zellen im Mikrolymphozytotoxizitätstest verwendet.

Die Anti-HLA-Kontrollen sind lyophilisiert und vor Gebrauch mit der auf dem Etikett angegebenen Menge Aqua dest. aufzulösen. Die Rehydrierung dauert 10 - 15 Minuten.

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).

Isolierung der Lymphozyten

Die Testdurchführung der Isolierung der Lymphozyten mittels Dichtegradienten oder der Immuno-Beads-Technik (IMB) ist den Gebrauchsinformationen der Hersteller zu entnehmen.

Testdurchführung – Mikrolymphozytotoxizitätstest (Klasse I)

1. Die Vertiefungen (Kavitäten) der Mikrotestkammern mit ca. 5-10 µl Paraffinöl füllen.
2. Mit einer Mikroliterspritze 1 µl Anti-HLA-Serum und 1 µl Lymphozytensuspension (ca. 2000-3000 Zellen) unter das Öl vorlegen. 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. In jede Kavität 5 - 6 µl Kaninchenkomplement zugeben und 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren (Zytolyse-Reaktion).
5. 3 - 4 µl Eosin-Lösung (5% wässrig) pro Kavität zugeben und nach 5 - 10 Minuten mit 5 - 6 µl Formaldehydlösung (37%) fixieren (Färbe- und Fixierungsreaktion).
6. Nach Sedimentation der Lymphozyten (30 - 60 Minuten) ist eine mikroskopische Auswertung im Umkehr-Phasenkontrastmikroskop möglich. Kurz vor dem Mikroskopieren muss ein Deckglas aufgelegt werden.

Testdurchführung -IMB-Technik (Klasse II)

1. Die Vertiefungen (Kavitäten) der Mikrotestkammern mit ca. 5-10 µl Paraffinöl füllen.
2. Mit einer Mikroliterspritze 1 µl Anti-HLA-Serum und 1 µl IMB-B-Lymphozytensuspension (ca. 1.000 Zellen) unter das Öl vorlegen. 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 zugeben. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
5. 5 µl Acridinorange / Ethidiumbromid / EDTA-Lösung zugeben.
6. Im Fluoreszenzmikroskop ablesen.

Leistungsdaten

Die Anti-HLA-Positiv-Kontrollseren sind in der Qualitätskontrolle mit mindestens 50 T- bzw. B-Lymphozytensuspensionen verschiedener Spender getestet und reagieren den Vorgaben entsprechend positiv (8 Score).

Die Anti-HLA-Negativ-Kontrollseren sind in der Qualitätskontrolle mit mindestens 50 T/ B-Lymphozytensuspensionen verschiedener Spender getestet und reagiert den Vorgaben entsprechend negativ (max. 2 Score).

Fehlerquellen

Ursache falsch negativer oder schwacher Reaktionen

- Erythrozyten können das Ablesen erschweren
- Kontamination mit Thrombozyten
- Zu hohe Lymphozytenzahl
- Gelbfärbung der Anti-HLA-Seren

- Seren zu oft 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

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

Wichtiger Hinweis

Anti-HLA Positive Control ist nicht für den Einsatz mit DTT (Dithiothreitol) geeignet. Es kann zu falsch negativen Reaktionen kommen, da die in der Kontrolle enthaltenen monoklonalen Antikörper vom Kaninchen sich anders als humane IgG Antikörper verhalten können, wenn sie mit DTT behandelt werden.

Literatur

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

Warn- und Entsorgungshinweise

Anti-HLA-Kontrollseren 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 Testreagenzien enthalten NaN₃ als Konservierungsmittel. Die in den gelösten Reagenzien enthaltene Konzentration von < 0,1% NaN₃ gilt 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 in den Reagenzien enthaltenen Azidmengen sind klein, trotzdem sollte bei der Beseitigung von Azidhaltigem Material mit reichlich Wasser nachgespült werden.

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

Für die Formaldehyd- und Acridinorange/Ethidiumbromid- Lösung sollten die Warn- und Entsorgungshinweise des Herstellers befolgt werden.

R-Sätze 22-52/53 (nur für Anti-HLA-Seren im lyophilisierten Zustand)

Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern langfristig schädliche Wirkungen haben.

S-Sätze 22-61 (nur für Anti-HLA-Seren im lyophilisierten Zustand)


Staub nicht einatmen.

Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.

Sicherheitsdatenblätter auf Anfrage erhältlich.

Anti-HLA-Kontrollseren nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen.

Konservierungsmittel:

< 1% NaN₃ (lyophilisiert),  gesundheitsschädlich; < 0,1% NaN₃ (aufgelöst)

Haltbarkeit:











- lyophilisiert: bis zum aufgedruckten Datum auf dem Etikett
- aufgelöst: 3 Monate

Lagerung:

2...8°C, aufgelöst ≤ -20°C

Packungsgröße:

0,5 ml, human oder monoklonal, lyophilisiert

Erklärung der Symbole auf den Etiketten			
	Lagertemperatur		Lymphozytotoxizitätstest nach NIH
	Verwendbar bis		Gebrauchsinformation beachten
	Anti-HLA-Seren		In-vitro-Diagnostikum
	Bestell-Nummer		Lot-Nummer
	Ursprung: Human		Lyophilisiert

Version 1/2013



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

Anti-HLA Negative Control Anti-HLA Positive Control Anti-HLA Positive Control B-Cell Anti-HLA Positive Control T-Cell



Microlymphocytotoxicity Test (NIH)

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Description of product

Anti-HLA Positive Control consists of an anti-human lymphocyte globulin (IgG) from rabbit, which is pooled with polyspecific human antisera.

Anti-HLA Negative Control consists of a serum pool from different male donors of blood group AB, which shows no HLA antibody reactivity.

Anti-HLA Positive Control and Anti-HLA Negative Control are used as control reagents in the microlymphocytotoxicity test for in vitro diagnostic of human HLA- Class I and/or-Class II antigens / antibodies.

Anti-HLA Positive Control B-Cell and T-Cell are used in the microlymphocytotoxicity test to verify the purity of the separated cells.

The Anti-HLA Controls are lyophilized. Before use dissolve the lyophilized Anti-HLA control sera with the required volume of aqua dest. as stated on the label. The reconstitution takes 10 - 15 minutes.

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.

Isolation of lymphocytes

Isolation of the lymphocytes using density gradient or Immuno Beads method (IMB) according to manufacturers instructions.

Test procedure – Microlymphocytotoxicity test (Class I)

1. Fill the wells of micro test trays with approx. 5 - 10 µl mineral oil.
2. Pipet into each well 1 µl Anti-HLA serum under the oil using a microliter syringe. Add 1 µl of lymphocyte suspension (app. 2000 - 3000 cells) under the oil. In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
3. Incubate for 30 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature).
4. Add 5 - 6 µl rabbit complement to each well and incubate for 60 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature) (cytolytic reaction).
5. Add 3 - 4 µl eosin solution (5% aqueous) to each well and fix after 5 - 10 minutes with 5 - 6 µl formaldehyde solution (37%) (staining and fixation).
6. After sedimentation of lymphocytes (30 - 60 min.) read the micro test trays using an inversed phase microscope. Cover the tray with a cover glass shortly before reading.

Test procedure - IMB technique (Class II)

1. Fill the wells of micro test trays with approx. 5 - 10 µl mineral oil.
2. Pipet into each well 1 µl Anti-HLA serum under the oil using a microliter syringe. Add 1 µl of IMB-B-lymphocyte suspension (app. 1.000 cells) under the oil. In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
3. Incubate for 30 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature).
4. Add 5 µl rabbit complement. Incubate for 60 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature).
5. Add 5 µl acridineorange / ethidiumbromide / EDTA-solution
6. Read under a fluorescence microscope.

Performance characteristics

The Anti-HLA-Positive Control sera are tested in quality control with at least 50 T-and B-lymphocyte suspensions from different donors and react according to specifications positive (score 8).

The Anti-HLA Negative control sera are tested in quality control with at least 50 T / B lymphocyte suspensions from different donors and reacts according to specifications negative (max. 2 score).

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
- Sera have been thawed and refrozen too often
- Reconstituted complement kept too long at room temperature before use

- Residual complement was frozen and thawed again
- Incubation time were too short
- Incubation temperature were too low

Causes of false positive reactions

- Incubation time were too long
- Incubation temperature were too high
- Prior damage of lymphocytes (negative control is positive = „background“)
- Failure to add fixative
- Carry over due to pipetting

Limitation

Anti-HLA Positive Control is not suitable for use with DTT (Dithiothreitol). False negative reactions may occur, because the monoclonal antibodies from rabbit contained in the control may behave differently from human IgG antibodies when treated with DTT.

Literature

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

Warnings and Precautions

Anti-HLA-Control sera 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, 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).

The test reagents contain NaN₃ as a preservative. The dissolved reagents contain < 0.1% NaN₃ 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 Formaldehyde and Acridineorange/Ethidiumbromide- solutions please note the warnings and precautions of the manufacturer.

Risk phrases (R) 22-52/53 (only for non dissolved Anti-HLA sera)

Harmful if swallowed.

Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.


Safety phrases (S) 22-61 (only for non dissolved Anti-HLA sera)

Do not breathe dust.

Avoid release to the environment. Refer to special instructions / Safety data sheets.

Material Safety Data Sheets available on request

Do not use **Anti-HLA-Control sera** beyond the indicated expiration date on the label.











Preservative: < 1% NaN₃ (lyophilized),  harmful; < 0.1% NaN₃ (dissolved)

Shelf life:

- in lyophilized form until the expiration date indicated on the label
- in dissolved form: 3 months

Storage: 2...8°C, dissolved at least at ≤ -20°C

Package: 0.5 ml, human or monoclonal, lyophilized

Explanation of symbols used on Labelling			
	Storage temperature		Lymphocytotoxicitytest according to NIH
	Use by		Consult Instructions for use
	Anti-HLA-Sera		For in vitro diagnostic use
	Catalogue number		Batch code
	Origin: human		Lyophilised

Instructions for use in other languages see <http://www.bag-healthcare.com> or phone +49 (0)6404-925-125

Version 1/2013



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