

DE**GEBRAUCHSINFORMATION****HISTO TRAY RESERVOIR
HLA Klasse II****CE₀₁₂₃****IN VITRO DIAGNOSTIKA****HISTO TRAY DR 72 RESERVOIR** **REF 6285****Produktbeschreibung**

HISTO TRAY RESERVOIR sind Vorratsgefäße mit Anti-HLA-Seren und Kontrollen für die Gewebetypisierung der HLA-Klasse II Antigene. Worksheets zur Auswertung und Ergebnislisten sind beigefügt.

Testprinzip

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

Zusätzlich benötigte Materialien

Aqua dest., Paraffinöl

Mikrotestplatten mit 60 oder 72 Kavitäten (z.B. Fa. Greiner), Tropfgerät für 1 – 5 µl, Mikroliterspritzen für 1 – 5 µl

Optional: Vakuumeinschweißgerät, Vakuumbbeutel

Immuno-Beads-Technik oder Immunorosettierungsmethode

Immuno Beads oder HLA B Cell Enrichment Cocktail (s. Herstellerangaben)

Kaninchenkomplement (10 x 1 ml **REF** 7018, 10 x 5 ml **REF** 7023)

Acridinorange/Ethidiumbromid, Quenching-Lösung, EDTA (8% wässrig)

Fluoreszenzmikroskop

Testdurchführung – Tropfen der Mikrotestplatten

1. Vorratsgefäß mit den Anti-HLA-Seren und Kontrollen auftauen.
2. Mikrotestplatten mit Produktnamen, Lotbezeichnung und Haltbarkeitsdatum wasserfest kennzeichnen.
3. Mikroliterspritze oder Tropfgerät mindestens 3 x mit jeweils frischem Aqua dest. spülen. Wird ein Tropfgerät eingesetzt, ist die Bedienungsanleitung des Herstellers zu beachten.
4. In jede Kavität der Mikrotestplatten 5 µl Paraffinöl tropfen.
5. Dann aus dem Vorratsgefäß je 1 µl Anti-HLA-Serum bzw. Kontrolle in die entsprechende Kavität tropfen. Es ist darauf zu achten, dass sich das rotgefärbte Serum am Boden der Kavität unter dem Paraffinöl befindet.
6. Bis zur Verwendung die betropften Mikrotestplatten bei ≤ -20°C einfrieren. Für die Lagerung wird empfohlen, die betropften Platten in Vakuumbbeutel unter Vakuum einzuschweißen.

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

Die Isolierung der B-Lymphozyten mit der Immuno-Beads (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. Mikrotestplatten mit den vorgetropften Anti-HLA-Seren auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
3. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl B-Lymphozytensuspension geben. Ca. 1000 Zellen bei der Isolierung mit der IMB-Technik, ca. 1000 – 200 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 Isolierung mit der IMB-Technik: 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren. Bei Isolierung 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. 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

- Zu wenig Anti-HLA-Serum getropft
- 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 viel Anti-HLA-Serum getropft
- 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. 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 RESERVOIR zu entnehmen.

Literatur

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

Warn- und Entsorgungshinweise

HISTO TRAY RESERVOIR 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 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.

Sicherheitsdatenblätter auf Anfrage erhältlich




HISTO TRAY RESERVOIR 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 Etikett

Erklärung der Symbole auf den Etiketten			
IVD	In vitro Diagnostikum		Lagertemperatur
HLA TYPING	Zweckbestimmung: HLA-Typisierung		Verwendbar bis
LOT	Lot-Nr.		Gebrauchsinformation beachten
REF	Bestell-Nr.		

Version: 1 / 2015 | Stand: 2015-02



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 RESERVOIR
HLA Class II**

CE0123

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

HISTO TRAY DR 72 RESERVOIR **REF** 6285

Description of product

HISTO TRAY RESERVOIR are storage trays with anti-HLA sera and controls for tissue typing of HLA class II antigens. Worksheets for evaluation and the listing of test results are enclosed.

Test principle

Anti-HLA sera 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.

Additional materials required

Aqua dest., paraffin perliquidum

Microtest plates with 60 or 72 wells (e.g. Greiner), automatic dropper for 1 – 5 µl, microliter syringe for 1 – 5 µl

Optional: Vacuum packing machine, vacuum bags

Immuno Beads technique or Immunorosettes technique

Immuno Beads or HLA B Cell Enrichment Cocktail (details see manufacturer)

Rabbit complement (10 x 1 ml **REF** 7018, 10 x 5 ml **REF** 7023)

Acridinorange/Ethidiumbromide, quenching-solution, EDTA (8% aqueous)

Fluorescence microscope

Test procedure – Dropping of microtest plates

1. Thaw storage tray with anti-HLA sera and controls.
2. Label microtest plates with product name, lot and expiry date (water proof labelling).
3. Flush microliter syringe or automatic dropper at least 3 x with fresh aqua dest. If using an automatic dropper, note the instruction manual of the manufacturer.
4. Drop 5 µl paraffin perliquidum in each well of the microtest plate.
5. Drop 1 µl anti-HLA serum or control from the storage tray into the respective well.
Pay attention that the red coloured serum is located under the paraffin perliquidum at the bottom of the well.
6. Store the dropped microtest plates at ≤ -20°C up to use.
It is recommended to weld the dropped plates in vacuum bags under vacuum for storage.

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

Isolation of the B-lymphocytes using the Immuno Beads (IMB) technique or the Immunorosettes technique as well as staining and fixation reagents according to manufacturer instructions.

Test procedure

1. Isolate cells with IMB technique or Immunorosettes technique.
2. Bring the microtest plates with predropped anti-HLA sera 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 technique 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 technique: 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 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	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

- The amount of anti-HLA serum is too low
- 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 time were too short
- Incubation temperature were too low

Causes of false positive reactions

- Cross reactions
- The amount of anti-HLA serum is too high
- Incubation time were too long
- Incubation temperature were too high
- Prior damage of lymphocytes (negative control is positive = „background“)
- Failure to add fixative

Rabbit Complement

Dissolve 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 RESERVOIR 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 RESERVOIR 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 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 note the warnings and precautions of the manufacturers.

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 RESERVOIR** 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 labels

Explanation of symbols used on Labelling			
IVD	For in vitro diagnostic use		Storage temperature
HLA TYPING	Intended purpose: HLA typing		Use by
LOT	Batch code		Consult Instructions for use
REF	Catalogue number		

Version: 1 / 2015 | Issue: 2015-02



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