

Návod k použití

CE 0123

HISTO TRAY HLA I. třídy

in vitro diagnostikum **IVD**

HISTO TRAY AB 72 (10)	REF 7027	HISTO TRAY B27 (10)	REF 7006
HISTO TRAY AB 120 (5)	REF 7042	HISTO TRAY B27 (20)	REF 7008
HISTO TRAY AB 144 (5)	REF 7043	HISTO TRAY B27 (50)	REF 7009
HISTO TRAY ABC 72 (10)	REF 7022	HISTO TRAY B27 forte (10)	REF 7004
HISTO TRAY ABC 120 (5)	REF 7013		
HISTO TRAY ABC 144 (5)	REF 7035		

Popis výrobku

Soupravy HISTO TRAY jsou určeny pro tkáňovou typizaci antigenů I. HLA třídy a jsou vyrobeny z předem nakapaných anti - HLA antisér a kontrol. Králičí komplement, pracovní návod a protokol pro zaznamenání výsledků jsou součástí každého balení.

Princip testu

HLA-antiséra reagují s odpovídajícími povrchovými antigeny lidských lymfocytů. Následné přidání králičího komplementu vede ke strukturálním změnám buněčné stěny, což způsobí její penetraci a tento proces je detekován pomocí změny barvy do reakce přidaného indikátoru. Zbarvené lymfocyty = pozitivní reakce. V případě, že k reakci antigen-protilátka nedojde, buněčná stěna zůstane neporušená. Když nedojde k penetraci, buňka se indikátorem neobarví a jedná se tak o negativní reakci.

Pracovní postup – izolace lymfocytů z např. heparinizované krve

1. Nejprve potřebujeme docílit zvýšení podílu buněk. Proto zředte 4ml heparinizované krve (50 I.U./ml) se 4 ml buněčného kultivačního média (např. RPMI1640).
2. Napipetujte 4 – 5 ml buněčného separačního média, např. HISTOPREP do centrifugační zkumavky (12ml).
3. Opatrně přidejte cca 6 ml zředěné krve pomocí Pasteurovy pipety po vnitřní straně zkumavky, abyste dosáhli gradientu.
4. Centrifugujte 15 minut při 1200 x g a pokojové teplotě v rozmezí 18...22 °C. Použijte centrifugu bez brzdy!
5. Oddělte vrstvu lymfocytů (interfáze) pomocí Pasteurovy pipety a napipetujte je do nové zkumavky.
6. Proveďte promývání lymfocytů přidáním buněčného kultivačního média, např. RPMI 1640 a následnou centrifugací po dobu 10 minut při 550 x g. Pak odstraňte supernatant a resuspendujte sediment přidáním buněčného kultivačního média, např. RPMI 1640.
7. Centrifugujte 10 minut při 230 x g, odstraňte supernatant, resuspendujte sediment a přidejte buněčné kultivační médium, např. RPMI 1640.
8. Centrifugujte 10 minut při 110 x g a odstraňte supernatant.
9. Resuspendujte sediment v buněčném kultivačním médiu, např. RPMI 1640 a upravte koncentraci na 2000 – 3000 lymfocytů na μ l (např. Neubauerova komůrka pro počítání buněk čítač buněk).

Pracovní postup – mikrolymfocytotoxický test (NIH technika)

1. Vytemperujte destičky ze soupravy HISTO TRAY na teplotu 18 – 22 °C (pokojovou teplotu) .
2. Napipetujte 1 μ l suspenze lymfocytů (cca 2000 – 3000 buněk) do každé předkapané jamky Terasakiho destičky. Aby došlo k reakci antigen-protilátka je nezbytné, aby se antisérum a buňky vzájemně smíchaly.
3. Inkubujte při teplotě 18 – 22 °C (pokojová teplota) po dobu 30 minut.
4. Přidejte 5 – 6 μ l králičího komplementu.
5. Inkubujte při teplotě 18 – 22 °C (pokojová teplota) po dobu 60 minut.
6. Přidejte 3 – 4 μ l Eosinu (5% vodná) a inkubujte po dobu 5 - 10 minut.

7. Fixujte pomocí 5 – 6µl formaldehydu (37% pH 7,2) a nechte sedimentovat lymfocyty nejméně 60 minut.
8. Přikryjte destičku krycím sklíčkem těsně před odečítáním výsledků a odečítejte výsledky v invertovaném fázovém mikroskopu.

Pracovní postup – izolace T-lymfocytů z např. heparinizované krve

Izolace T-lymfocytů za pomoci „Immuno Beads“ metody se provádí stejně jako barvení a fixace reagií dle návodu výrobce.

Pracovní postup – „Immuno Beads“ metoda (IMB)

1. Vytemperujte desky ze soupravy HISTO TRAY na teplotu 18 – 22 °C (pokojovou teplotu) .
2. Napipetujte 1µl suspenze IMB -T- lymfocytů (cca 1000 buněk) do předkapaných jamek. Aby došlo k reakci antigen-protilátka je nezbytné, aby se antisérum a buňky vzájemně smíchaly.
3. Inkubujte při teplotě 18 – 22 °C (pokojové teplotě) po dobu 30 minut.
4. Přidejte 5 µl králičího komplementu Acridinoranž/Ethidiumbromid (AO/EB) (1000 µl králičího komplementu + 20 µl AO/EB).
5. Inkubujte po dobu 60 minut při teplotě 18 – 22 °C (pokojové teplotě) ve tmě.
6. Přidejte 5 µl EDTA/zastavovacího roztoku (2000 µl zastavovacího roztoku + 1000 µl EDTA 8%).
7. Odečítejte HISTO TRAY ve fluorescenčním mikroskopu.

Vyhodnocení výsledků

Množství lyzovaných lymfocytů je porovnáváno s celkovým množstvím lymfocytů a je udáváno v každé jamce zvlášť jako výsledná hodnota označovaná jako „Score“.

% lyzovaných buněk	Vyhodnocení
0 – 19% = Score 1	negativní
20 – 39% = Score 2	nejistý negativní
40 – 59% = Score 4	slabě pozitivní
60 – 79% = Score 6	pozitivní
80 – 100% = Score 8	silně pozitivní
= Score 0	nelze hodnotit

Řešení problémů

Příčiny falešně negativních výsledků nebo slabých reakcí

- Kontaminace erytrocytů může způsobit problémy při odečítání v mikroskopu.
- Kontaminace krevními destičkami
- Příliš velké množství lymfocytů.
- Žluté zbarvení HLA antiséra.
- Opakované zamrazování a rozmrazování testovacích destiček.
- Rekonstituovaný komplement byl příliš dlouho ponechán při pokojové teplotě před použitím.
- Zbýlý komplement byl opakovaně zamrazován a rozmrazován.
- Příliš krátké inkubační doby.
- Příliš nízké inkubační teploty.

Příčiny falešně pozitivních výsledků

- Zkřížená reaktivita.
- Příliš dlouhé inkubační doby.
- Příliš vysoké inkubační teploty.
- Lymfocyty poškozené ještě před testováním (negativní kontrola je pozitivní = „pozadí“).
- Nedostatečné množství fixativ.

Králičí komplement

Rekonstituujte lyofilizovaný komplement 1 ml destilované vody (dle velikosti balení). Rekonstituce trvá cca 10 - 15 minut. Rekonstituovaný komplement musí být uchováván v chladu (+2...+8 °C) a použit během 3 - 4 hodin.

NEZMRAZUJTE již zředěný králičí komplement!

Výkonnost testu

Povšimněte si, prosím, příbalové informace uvnitř každého balení HISTO TRAY, kde jsou uvedeny výsledky testování těchto diagnostik vyjádřené formou jejich citlivosti a specifity (R-hodnota).

Literatura

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

Upozornění a bezpečnostní opatření

HISTO TRAY destičky a králičí komplement jsou diagnostika určená pro použití in vitro a měla by být používána pouze dobře vyškoleným personálem se zkušenostmi s testováním histokompatibility. Obzvláště v případě sporných výsledků by měly následovat postupy, které jsou v souladu se směrnici pro transplantace a EFI směrnici.

K výrobě reagensů těchto diagnostických souprav je používán materiál lidského původu, který je předem testován na HBsAg, HIV a HCV, protilátky. K výrobě diagnostik je používán pouze materiál negativní na HCV, HBsAg a HIV protilátky. Ačkoliv v tomto materiálu nebyly výše uvedené viry prokázány, jedná se o biologický materiál, stejně jako jsou testované vzorky krve a séra a také kontrolní séra, proto by s nimi mělo být zacházeno jako s potenciálně infekčními, neboť žádný test nemůže se 100% spolehlivostí zaručit, že daný materiál není infekční. Při práci s biologickým materiálem dodržujte náležitě bezpečnostní postupy (nepipetujte ústy, používejte rukavice a desinfikujte po skončení práce ruce).

Vzorky i reagentie používané během testu představují určité riziko a jsou považovány za potenciálně infekční materiál. Proto je nezbytné je před likvidací inaktivovat (např. sterilizací v autoklávu). Pokud dojde k rozliti potenciálně infekčního materiálu, je nezbytné toto místo okamžitě vysušit pomocí savých papírových ubrousků a poté desinfikovat 70% alkoholem. Materiál použitý na vyčištění kontaminovaných míst je nutné před likvidací inaktivovat např. sterilizací v autoklávu.

Likvidace veškerého odpadu by se měla řídit platnými zákonnými normami.

Anti-HLA séra obsahují jako konzervační činidlo azid sodný NaN_3 . NaN_3 je škodlivý při nadechnutí, polknutí, či při dotyku s pokožkou či sliznicemi. Reagentie obsahují NaN_3 v koncentraci <0,1% a tato koncentrace není považována za nebezpečnou. Azid sodný může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vzniku výbušných solí. Přestože je množství azidu sodného v reagentiích velmi malé, je žádoucí splachovat vylévané reagentie obsahující azid sodný silným proudem vody, abychom napomohli rozložení nežádoucích azidů.

Při práci se zastavovacím roztokem, formaldehydem a Acridinoranž/Ethidiumbromidem (AO/EB) dodržujte bezpečnostní pokyny výrobce.

Pokud i po rozmrazení zůstávají anti-HLA séra žlutě zbarvena, může to znamenat změnu pH. Tyto desky **by neměly být** pro testování používány!

Bezpečnostní listy jsou k dispozici na vyžádání.

Nepoužívejte **HISTO TRAY destičky a králičí komplement** s prošlou expirační lhůtou.





Ta je vyznačena na etiketě každé soupravy.

Konzervační činidlo: < 0,1% NaN_3

Skladování: $\leq -20^\circ\text{C}$

Doba použitelnosti: do data expirace uvedeného na etiketě každé soupravy/reagentie

Balení: vyznačeno na etiketě každé soupravy

Vysvětlivky k symbolům použitým na etiketách			
	Použitelné do		Nahlédněte do návodu k použití
	Teplota skladování		Dostatečné pro n testů
ANTI-HLA-SERA	Anti-HLA-séra	LOT	Číslo šarže
COMPLEMENT RAB	Králičí komplement	LYOPH	Lyofilizováno
CONT	Obsah, obsahuje	MICROTESTTRAY	Mikrotitrační destička s předkapanými antiséry a kontrolami
CONTROL -	Negativní kontrola	MONOCL	Monoklonální
CONTROL +	Pozitivní kontrola	OR	Nebo
HLA TYPING	Zamýšlené použití: HLA typizace	POLYCL	Polyklonální
HUM	Původ: humánní	REF	Katalogové číslo
IFU	Návod k použití	WORKSHEET	Pracovní list
IVD	Pro použití in vitro		

Verze 2/2015 | publikováno 2015-02

BAG Health Care GmbH
 Na Hlínách 555/17, 182 00 Praha 8
 Tel.: +420 286 840 508
 Fax: +420 286 840 510
 E-mail: info@bag-healthcare.cz
www.bag-healthcare.cz