

UPUTSTVO ZA UPOTREBU

HISTO TRAY Complement ABC



ZA PRIMENU U IN VITRO DIJAGNOSTICI

Opis proizvoda

HISTO TRAY Complement ABC je pogodan za ispitivanje aktivnosti zečjeg komplementa izvođenjem mikrolimfotoksičnog testa prema nemačkim i evropskim vodičima (DGI, EFI). Mikroploča spremna za upotrebu sadrži već ukapana tri HLA-ABC antiseruma u određenim razblaženjima i dodatno pozitivne i negativne kontrole. U pakovanje su uključene radni liste za evaluaciju.

Testiranje treba obavljati upotrebom tri različite suspenzije ćelija:

2 uzorka sa odgovarajućim antigenima

1 uzorak sa neodgovarajućim antigenima (negativna kontrola)

Preporučuje se upotreba referentnog uzorka zečjeg komplementa.

Princip testa

HLA-antiserum reaguje sa odgovarajućim antigenima vezanim za membranu humanih limfocita. Dodavanjem zečjeg komplementa dolazi do strukturne promene na ćelijskoj membrani što dovodi do penetracije indikatorske boje. Obojeni limfociti = pozitivna reakcija. U slučaju izostanka antigen-antitelo reakcije ili vrlo slabe aktivnosti komplementa, ćelijska membrana je nepromenjena. Ne dolazi do penetracije indikatorske boje i ćelije ostaju neobojene = negativna reakcija.

Izolacija limfocita

Izolacija limfocita iz heparinizirane krvi pomoću medijuma za separaciju ćelija, npr. HISTOPREP, za NIH-tehniku ili pomoću Immuno Beads za Immuno Beads metodu treba da se izvodi u skladu sa instrukcijama za upotrebu proizvođača.

Zečji Komplement

Rekonstituišite liofilizovani komplement neposredno pre korišćenja prema instrukcijama proizvođača.

Otopite zamrznuti zečji komplement neposredno pre korišćenja.

Čuvajte rekonstituisani ili otopljeni komplement na hladnom (2...8°C) i upotrebite u roku od 3-4 sata.

NEMOJTE PONOVO ZAMRZAVATI rastvoren ili otopljen zečji komplement!

Procedura testa NIH tehnika

- Otopite ploče 10 - 15 minuta pre korišćenja.
- Dodajte 1 µl suspenzije limfocita (2000 - 3000 ćelija/µl) u svaku čašicu HISTO TRAY Complement ABC ploče.
- Inkubirajte na temperaturi od 18...22°C 30 minuta.
- Kako bi se pregledao specifičan lot zečjeg komplementa pripremite razblaženja 1:2 i 1:4 sa RPMI 1640 ili izotoničnim fiziološkim rastvorom.
- Dodajte 5 - 6 µl zečjeg komplementa na sledeći način:

• red 3, 7, 11	razblaženje	1:4
• red 2, 6, 10	razblaženje	1:2
• red 1, 4, 5, 8, 9, 12	nerazblaženi	1:1

 Kako biste izbegli carry over, počnite pipetiranje zečjeg komplementa od nižih do visokih koncentracija.
- Inkubirajte na temperaturi od 18...22°C 60 minuta.
- Dodajte 3 - 4 µl eozina (5%), posle 5 minuta dodajte 5 - 6 µl formaldehida (37%, pH 7.2) za fiksaciju.
- Ako je potrebno, stavite stakleni poklopac na ploču pre tumačenja pod mikroskopom.
- Obezbedite da dođe do sedimentacije limfocita pre čitanja (60 minuta).

Procedura testa IMB-metod

- Otopite ploče 10 - 15 minuta pre korišćenja.
- Dodajte 1 µl suspenzije limfocita (približno 1000 ćelija/µl) u svaku čašicu HISTO TRAY Complement ABC ploče.
- Inkubirajte na temperaturi od 18...22°C 30 minuta.
- Kako bi se pregledao specifičan lot zečjeg komplementa pripremite razblaženja 1:2 i 1:4 sa RPMI 1640 ili izotoničnim fiziološkim rastvorom.
- Dodati 5 - 6 µl zečjeg komplementa na sledeći način:

• red 3, 7, 11	razblaženje	1:4
• red 2, 6, 10	razblaženje	1:2
• red 1, 4, 5, 8, 9, 12	razblaženje	1:1

 Kako biste izbegli carry over, počnite pipetiranje zečjeg komplementa od nižih do visokih koncentracija.
- Inkubirajte na temperaturi od 18...22°C 60 minuta.
- Dodajte 3 µl akridin oranž/etidumbromid rastvora za bojenje, 1 µl crnog mastila i 3 µl EDTA rastvora (5%).
- Koristite fluorescentni mikroskop za brzo očitavanje.

Procena rezultata

Količina liziranih limfocita upoređena sa ukupnom količinom limfocita navodi se kao vrednost rezultata u svakoj čašici.

<u>% liziranih ćelija</u>	<u>Procena</u>
0 - 19% = Rezultat 1	negativno
20 - 39% = Rezultat 2	sumnjivo negativno
40 - 59% = Rezultat 4	slabo pozitivno
60 - 79% = Rezultat 6	pozitivno
80 - 100% = Rezultat 8	jako pozitivno
= Rezultat 0	nije moguće zaključiti

Antigeni treba da daju jasne reakcije sa odgovarajućim nerazblaženim antiserumima upotrebom minimalnog razblaženja zečjeg komplementa od 1:2.

U zavisnosti od aktivnosti komplementa mogu se pojaviti fenomeni prozona.

Moguće poteškoće u radu

Uzroci lažno negativnih ili slabih reakcija

- Kontaminacija eritrocita može otežati mikroskopiranje
- Kontaminacija trombocitima
- Isuviše velika količina limfocita
- Žuta obojenja HLA antiseruma
- Ploče su bile otopljene pa ponovo zamrznute
- Rekonstituisani komplemen predugo držan na sobnoj temperaturi pre korišćenja
- Preostali komplemen zamrznut pa ponovo otopljenje
- Prekratko vreme inkubacije
- Preniska temperatura inkubacije

Uzroci lažno pozitivnih reakcija

- Predugo vreme inkubacije
- Previsoka temperatura inkubacije
- Ranije oštećenje limfocita (negativna kontrola je pozitivna = „pozadina“)
- Nije dodan fiksativ

Literatura

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

Upozorenja i mere predostrožnosti

HISTO TRAY Complement ABC je dizajniran isključivo za primenu u in vitro dijagnostici i treba da ga koristi adekvatno obučeno osoblje, iskusan u testovima histokompatibilnosti. Treba pratiti vodiče za transplataciju, kao i EFI standard. Materijal humanog porekla koji je korišćen za proizvodnju ovog reagensa pokazao se negativnim pri testiranju na HBsAg i HIV i HCV antitela. Bez obzira na to, sav biološki materijal koji se koristi treba smatrati potencijalno infektivnim, pošto nijedan metod testiranja ne može garantovati da materijal dobijen iz bioloških izvora ne sadrži infektivne agense. Prilikom rada sa biološkim materijalom, preporučuju se prigodne mere predostrožnosti (Ne pipetirajte ustima; prilikom rada sa biološkim materijalom, izvođenja testa nosite rukavice za jednokratnu upotrebu, dezinfikujte ruke kada završite testiranje).

Biološki materijal treba inaktivirati pre odbacivanja (npr. u autoklavu). Potrošni materijal treba nakon upotrebe autoklavirati ili spaliti. Prosut potencijalno infektivni materijal treba odmah ukloniti papirnim ubrusom i kontaminiranu površinu obrisati odgovarajućim standardnim dezinfekcionim sredstvom ili 70% alkoholom. Materijal kojim prosut materijal uklonjen, uključujući rukavice, treba inaktivirati pre odbacivanja (npr. u autoklavu).

Anti-HLA serumi sadrže < 0.1% NaN₃ kao konzervans. Koncentracija od < 0.1% NaN₃ ne smatra se štetnom koncentracijom. Ipak, izbegavajte da dođe do kontakta sa kožom i mukoznim membranama. U nekim vodoinstalacionim cevima mogu biti prisutni bakar i olovo koji mogu reagovati sa azidima i formirati eksplozivne soli. Količine azida koje se koriste u ovom reagensu su male; ipak, kada se baca materijal koji sadrži azide, treba ih isprati velikom količinom vode.

Uklanjanje svih uzoraka i materijala za testiranje treba da se obavlja u skladu sa državnim i lokalnim propisima.

Za rastvor formaldehida i akrinidinoranž/etidumbromid (AO/EB) pratite uputstva i mere predostrožnosti proizvođača.

Žuto obojenje anti-HLA seruma koje ostaje i nakon otapanja, može ukazati na promenu u pH vrednosti. Ovakve ploče **ne** treba koristiti za testiranje.





Nemojte koristiti **HISTO TRAY Complement ABC** nakon isteka roka trajanja označenog na etiketi.

Konzervans: < 0.1% NaN₃

Čuvanje: ≤ - 20°C

Rok trajanja: do isteka roka trajanja navedenog na etiketi

Pakovanje: prema informacijama naznačenim na kitu

Objašnjenje simbola na etiketama			
	Temperatura čuvanja		Dovoljno za n testova
	Koristiti do		Konsultovati uputstvo za upotrebu
ANTI-HLA-SERA	Anti-HLA-Serumi	IVD	Za primenu u in vitro dijagnostici
COMPEMENT TESTING	Namena: Testiranje komplemena	LOT	Broj šarže
CONT	Sadržaj, sadrži	MICROTESTTRAY	Mikrotest ploča sa već dodatim antiserumima i kontrolama
CONTROL +	Pozitivna kontrola	MONOCL	Monoklonski
CONTROL -	Negativna kontrola	POLYCL HUM	Poliklonski
HUM	Poreklo: humano	REF	Kataloški broj
IFU	Uputstvo za upotrebu	WORKSHEET	Radni list

Verzija 1/2013

Distributer za Srbiju: Yunycom d.o.o.: Tel.: 011/3606-987 / Fax: 011/3606-988 / office@yunycom.rs



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