BAG HEALTH CARE

GEBRAUCHSINFORMATION

HISTO TRAY Complement ABC

CE 0123

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-healthcare.com

HISTO TRAY Complement ABC REF 7003 IVD

Produktbeschreibung
HISTO TRAY Complement ABC dient der Aktivitätsprüfung von Kaninchenkomplement im Mikrolymphozytotoxizitätstest, gemäß den deutschen und europäischen Richtlinien (DGI, EFI).
Auf der gebrauchsfertigen Testplatte sind jeweils drei Anti-HLA-ABC-Seren in definierten Verdünnungen sowie positive und negative Kontrollen vorgetropft. Worksheets zur Auswertung sind beigefügt.

Die Testung sollte mit drei unterschiedlichen Zellsuspensionen erfolgen:
2 Proben mit korrespondierenden Antigenen
1 Probe mit nicht übereinstimmenden antigenen Eigenschaften (Negativkontrolle)

Das Mitführen eines Referenzkomplements bei jeder Testung ist empfehlenswert.

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 oder ist die Komplementaktivität zu schwach, bleibt die Zellmembran intakt. Die Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen (negative Reaktion).

Isolierung von Lymphozyten
Die Isolierung von Lymphozyten aus heparinisiertem Blut mit einem Zelltrennmedium, z.B. HISTOPREP, für die NIH-Technik oder mit Immuno-Beads für die Immuno-Beads-Technik sind den Gebrauchsinformationen des Herstellers zu entnehmen.

Kaninchenkomplement
Lyophilisiertes Kaninchenkomplement kurz vor Gebrauch entsprechend den Angaben des Herstellers rehydrieren.
Tiefgefrorenes Kaninchenkomplement kurz vor Gebrauch auftauen.
Aufgelöstes oder aufgetautes Kaninchenkomplement kühl (2...8°C) lagern und innerhalb von 3 - 4 Stunden verbrauchen.
Aufgelöstes oder aufgetautes Kaninchenkomplement NICHT bzw. NICHT WIEDER EINFRIEREN!

Testdurchführung NIH-Technik
1. Die Platten 10 - 15 Minuten vor Eintropfen der Zellen auftauen.
2. 1 µl Lymphozytensuspension (2000 - 3000 Zellen/µl) in jede Kavität der HISTO TRAY Complement ABC-Platte geben.
3. 30 Minuten bei 18...22°C inkubieren.
4. Das zu prüfende Lot Kaninchenkomplement 1:2 und 1:4 mit z.B. RPMI 1640 oder physiologischer Kochsalzlösung verdünnen.
5. 5 - 6 µl Kaninchenkomplement wie folgt zugeben:
   - Reihe 3, 7, 11 Verdünnung 1:4
   - Reihe 2, 6, 10 Verdünnung 1:2
   - Reihe 1, 4, 5, 8, 9, 12 unverdünnt 1:1

   Um Verschleppungen zu vermeiden, sollte das Kaninchenkomplement in aufsteigender Konzentration zugegeben werden.
6. 60 Minuten bei 18...22°C inkubieren.
7. 3 - 4 µl Eosin-Lösung (5%) zugeben und nach 5 Minuten mit 5 - 6 µl Formaldehyd-Lösung (37%, pH 7,2) fixieren.
8. Vor der Auswertung im Mikroskop, die Platte mit einem Deckglas abdecken.
9. Vor der mikroskopischen Ablesung die Lymphozyten sedimentieren lassen (60 Minuten).

Testdurchführung IMB-Technik
1. Die Platten 10 - 15 Minuten vor Eintropfen der Zellen auftauen.
2. 1 µl Lymphozytensuspension (ca. 1000 Zellen/µl) in jede Kavität der HISTO TRAY Complement ABC-Platte geben.
3. 30 Minuten bei 18...22°C inkubieren.
4. Das zu prüfende Lot Kaninchenkomplement 1:2 und 1:4 mit z.B. RPMI 1640 oder physiologischer Kochsalzlösung verdünnen.
5. 5 - 6 µl Kaninchenkomplement wie folgt zugeben:
   - Reihe 3, 7, 11 Verdünnung 1:4
   - Reihe 2, 6, 10 Verdünnung 1:2
   - Reihe 1, 4, 5, 8, 9, 12 unverdünnt 1:1

   Um Verschleppungen zu vermeiden, sollte das Kaninchenkomplement in aufsteigender Konzentration zugegeben werden.
6. 60 Minuten bei 18...22°C inkubieren.
7. 3 µl Acridinorange/Ethidiumbromid-Lösung, 1 µl Tusche und 3 µl EDTA-Lösung (5%) zugeben.
8. Die Platten sind im Fluoreszenzmikroskop sofort ablesbar.

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

Die Antigene sollten mit den korrespondierenden unverdünnten Antiseren mindestens bei einer Komplementverdünnung von 1:2 eindeutig positiv reagieren.
Abhängig von der Komplementaktivität können Prozonenphänomene auftreten.

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 Inkubationstemperatur

Ursache falsch positiver Reaktionen

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

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 Complement ABC ist nur für den in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von geschultem, in Histokompatibilitätstestung erfahrenem Fachpersonal angewendet werden. Transfusionsrichtlinien und EFI- / DGI-Standards sind zu beachten.

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 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).

Anti-HLA-Seren enthalten NaN_3 als Konservierungsmittel. In der enthaltenen Konzentration von < 0,1% gilt NaN_3 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.

Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter www.bag-healthcare.com heruntergeladen werden.

Für die Formaldehyd-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 Complement ABC nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums benutzen.

Konservierungsmittel:	< 0,1% NaN_3
Haltbarkeit:	bis zum aufgedruckten Datum auf den Etiketten
Lagerung:	≤ -20°C
Packungsgröße:	gemäß Angaben auf dem Kit

Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert		Ausreichend für n Tests
	Verwendbar bis		Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller	IVD	In-vitro-Diagnostikum
ANTI-HLA-SERA	Anti-HLA-Seren	LOT	Lot-Nummer
COMPLEMENT TESTING	Zweckbestimmung: Komplement Testung	MICROTESTTRAY	Mikrotestkammer mit vorgetropften Antiseren und Kontrollen
CONT	Inhalt, enthält	MONOCL	Monoklonal
CONTROL +	Positive Kontrolle	POLYCL HUM	Polyklonal
CONTROL -	Negative Kontrolle	REF	Bestell-Nummer
HUM	Ursprung: Human	WORKSHEET	Auswertungsbogen
IFU	Gebrauchsinformation		

Version 2/2018 / Stand: 2018-01

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

BAG HEALTH CARE

INSTRUCTIONS FOR USE

HISTO TRAY Complement ABC

CE 0123

Electronic instructions for use see www.bag-healthcare.com

HISTO TRAY Complement ABC REF 7003 IVD

Description of product

HISTO TRAY Complement ABC is suitable to examine the activity of rabbit complement performing the microlymphocytotoxicity test according to german and european guidelines (DGI, EFI).
The ready to use microplate is predropped with three HLA-ABC antisera in defined dilutions and additional positive and negative controls. Worksheets for evaluation are enclosed.

The testing should be done using three different cell suspensions:
2 samples with corresponding antigens
1 sample with non corresponding antigens (negative control)

Using a reference sample of rabbit complement during each investigation is recommended.

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 or a too weak complement activity, the cell membrane is intact. No penetration of indicator dye takes place and the cells remain unstained = negative reaction.

Isolation of lymphocytes

Isolation of lymphocytes from heparinized blood with a cell separation medium, e.g. HISTOPREP, for the NIH-technique or with Immuno Beads for the Immuno Beads method should be performed in according to the instructions for use of the manufacturer.

Rabbit Complement

Reconstitute lyophilized complement shortly before use according to instructions of the manufacturer.
Thaw frozen rabbit complement shortly before use.
Store reconstituted or thawed complement cool (2...8°C) and use it within 3 - 4 hours.
DO NOT FREEZE OR FREEZE AGAIN dissolved or thawed rabbit complement!

Test procedure NIH technique

1. Thaw plates 10 - 15 minutes before use.
2. Add 1 µl of lymphocyte suspension (2000 - 3000 cells/µl) to each well of the HISTO TRAY Complement ABC plate.
3. Incubate at 18...22°C for 30 minutes.
4. In order to examine a specific lot of rabbit complement prepare dilutions 1:2 and 1:4 with RPMI 1640 or isotonic saline.
5. Add 5 - 6 µl rabbit complement in the following manner:
   - row 3, 7, 11 dilution 1:4
   - row 2, 6, 10 dilution 1:2
   - row 1, 4, 5, 8, 9, 12 undiluted 1:1

   In order to avoid carry over, start pipetting the rabbit complement with low up to high concentration.
6. Incubate at 18...22°C for 60 minutes.
7. Add 3 - 4 µl eosin (5%), after 5 minutes add 5 - 6 µl formaldehyde (37%, pH 7.2) for fixation.
8. If necessary, place a coverglass onto the plate before interpretation under the microscope.
9. Allow sedimentation of lymphocytes before reading (60 minutes).

Test procedure IMB-method

1. Thaw plates 10 - 15 minutes before use.
2. Add 1 µl of lymphocyte suspension (approx. 1000 cells/µl) to each well of the HISTO TRAY Complement ABC plate.
3. Incubate at 18...22°C for 30 minutes.
4. In order to examine a specific lot of rabbit complement prepare dilutions 1:2 and 1:4 with RPMI 1640 or isotonic saline.
5. Add 5 - 6 µl rabbit complement in the following manner:
   - row 3, 7, 11 dilution 1:4
   - row 2, 6, 10 dilution 1:2
   - row 1, 4, 5, 8, 9, 12 undiluted 1:1

   In order to avoid carry over, start pipetting the rabbit complement with low up to high concentration.
6. Incubate at 18...22°C for 60 minutes.
7. Add 3 µl acridin orange/ethidium bromide staining solution, 1 µl black ink and 3 µl EDTA solution (5%).
8. Use fluorescence microscope for immediate reading.

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

The antigens should give clear cut reactions with corresponding undiluted antisera using minimum dilution 1:2 of rabbit complement.
Prozone phenomenons may appear depending on complement activity.

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 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

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 Complement ABC is 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. Human source material used to produce this reagent has been tested and found negative for HBsAg and HIV and HCV antibodies. Nevertheless all used biological material 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% NaN_3. A concentration of < 0.1% NaN_3 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.

The Material Safety Data Sheet (MSDS) is available to download at www.bag-healthcare.com .

For Formaldehyde 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.

Do not use **HISTO TRAY Complement ABC** beyond the indicated expiration date on the label.

Preservative:	< 0.1% NaN_3
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

	Storage temperature / Lower limit of temperature		Sufficient for n tests
	Use by		Consult Instructions for use
	Manufacturer	IVD	For in vitro diagnostic use
ANTI-HLA-SERA	Anti-HLA-Sera	LOT	Batch code
COMPLEMENT TESTING	Intended purpose: Complement testing	MICROTESTTRAY	Microtest tray with predropped antisera and controls
CONT	Content, contains	MONOCL	Monoclonal
CONTROL +	Positive control	POLYCL HUM	Polyclonal
CONTROL -	Negative control	REF	Catalogue number
HUM	Origin: human	WORKSHEET	Worksheet
IFU	Instructions for use		

Version 2/2018 / Issue: 2018-01

BAG

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