

SR

UPUTSTVO ZA UPOTREBU

HISTO TRAY HLA Klase I



ZA PRIMENU U IN VITRO DIJAGNOSTICI

Opis proizvoda

HISTO TRAY služi za tipizaciju tkiva određivanjem HLA antigena klase I, upotrebom mikroploča sa već razlivenim anti – HLA serumima i kontrolama. U pakovanje su uključeni zečji komplement, radne liste za evaluaciju i listing za rezultate testiranja.

Princip testa

HLA-antiserumi reaguju sa odgovarajućim antigenima vezanim za membranu humanih limfocita. Dodavanje zečjeg komplementa rezultira strukturalnom promenom ćelijske membrane, što omogućuje penetraciju indikatorske boje. Obojeni limfociti = pozitivna reakcija. U slučaju da nije došlo do reakcije antigen – antitelo, ćelijska membrana ostaje nepromenjena. Indikatorska boja ne prodire u ćeliju i ona ostaje neobojena = negativna reakcija.

Procedura testa – Izolacija limfocita iz npr. heparinizirane krvi

1. U cilju povećanja prinosa ćelija, razblažite 4 ml heparinizirane krvi (50 I.U./ml) sa 4 ml medijuma za ćelijske kulture (e.g. RPMI 1640).
2. Pipetirajte 4 - 5 ml medijuma za separaciju ćelija, npr. HISTOPREP, u epruvetu za centrifugiranje (12 ml).
3. Pažljivo Pasterovom pipetom dodajte oko 6 ml razblažene krvi do gradijenta duž unutrašnje ivice epruvete.
4. Centrifugirajte 15 minuta na 1200 x i temperaturi od 18-22°C (sobna temperatura). Centrifugirajte bez zaustavljanja.
5. Pasterovom pipetom skinite prsten sa limfocitima (interfaza) i prebacite u novu epruvetu za centrifugiranje.
6. Za ispiranje limfocita, napunite je medijumom za ćelijske kulture, npr. RPMI 1640, i centrifugirajte 10 minuta na 550 x g. Odbacite supernatant, resuspendujte sediment i napunite medijumom za ćelijske kulture, npr. RPMI 1640.
7. Centrifugirajte 10 minuta na 230 x g, odbacite supernatant, resuspendujte sediment sa dna i napunite medijumom za ćelijske kulture, npr. RPMI 1640.
8. Centrifugirajte 10 minuta na 110 x g i odbacite supernatant.
9. Resuspendujte sediment u medijumu za ćelijske kulture, npr. RPMI 1640, i prilagodite do krajnje koncentracije od 2000 - 3000 limfocita po μ l (Neubauer komora za brojanje ili brojač ćelija).

Procedura testa –NIH tehnika

1. Sačekajte da HISTO TRAY ploče dostignu temperaturu od 18-22°C (sobna temperatura).
2. Ukapajte po 1 μ l suspenzije limfocita (2.000 - 3.000 ćelija) u svako od polja na mikroploči sa već razlivenim serumima. Neophodno je da se antiserum i ćelije dodiruju kako bi se garantovala dovoljna reakcija antigen-antitelo.
3. Inkubirajte na temperaturi od 18-22°C (sobna temperatura) 30 minuta.
4. Dodajte 5 - 6 μ l zečjeg komplementa.
5. Inkubirajte na temperaturi od 18-22°C (sobna temperatura) 60 minuta.
6. Dodajte 3 - 4 μ l rastvora eozina (5% vodeni rastvor) (soft touch metodom) i inkubirajte 5 - 10 minuta.
7. Fiksirajte sa 5 - 6 μ l rastvora formaldehida (37%, pH 7.2) (soft touch metodom). Pustite da sedimentacija ćelija traje bar 60 minuta.
8. Pokrijte ploču pokrovnim staklom neposredno pre očitavanja pod invertnim fazno kontrastnim mikroskopom.

Procedura testa - izolacija T-limfocita iz npr. heparinizirane krvi

Izolacija T-limfocita korišćenjem metode imunomagnetnih partikula kao i reagensima za bojenje i fiksiranje prema instrukcijama proizvođača.

Procedura testa – metod imunomagnetnih partikula (Immuno Beads)

1. Sačekajte da HISTO TRAY ploče dostignu temperaturu od 18-22°C (sobna temperatura).
2. Ukapajte po 1 μ l suspenzije IMB-T limfocita (oko 1.000 ćelija) u svako od polja na mikroploči sa već razlivenim serumima. Neophodno je da se antiserum i ćelije dodiruju kako bi se garantovala dovoljna reakcija antigen-antitelo.
3. Inkubirajte na temperaturi od 18-22°C (sobna temperatura) 30 minuta.
4. Dodajte 5 μ l zečjeg komplementa + akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB) (1.000 μ l zečjeg komplementa + 20 μ l AO/EB).
5. Inkubirajte 60 minuta na temperaturi od 18-22°C (sobna temperatura) u mraku.
6. Dodajte 5 μ l EDTA-/quenching-rastvor (2.000 μ l quenching rastvor + 1.000 μ l EDTA 8% vodeni rastvor).
7. Očitajte HISTO TRAY ploče pod fluorescentnim mikroskopom.

Procena rezultata

Količina liziranih limfocita upoređena sa ukupnom količinom limfocita navodi se kao vrednost ocene u svakom polju.

% liziranih ćelija		Procena
0 – 19%	= Ocena 1	negativno
20 – 39%	= Ocena 2	sumnjivo negativno
40 – 59%	= Ocena 4	slabo pozitivno
60 – 79%	= Ocena 6	pozitivno
80 – 100%	= Ocena 8	jako pozitivno
	= Ocena 0	nije moguće zaključiti

Moguće poteškoće u radu

Uzroci lažno negativnih ili slabih reakcija

- Kontaminacija eritrocitima može da oteža mikroskopiranje
- Kontaminacija trombocitima
- Isuviše velika količina limfocita
- Žuto obojenje HLA antiseruma
- Ploče su bile otopljene pa ponovo zamrznute
- Rekonstituisani komplement predugo držan na sobnoj temperaturi pre upotrebe
- Preostali komplement zamrznut pa opet otopljen.
- Prekratka inkubacija
- Preniska temperatura inkubacije

Uzroci lažno pozitivnih reakcija

- Unakrsne reakcije
- Preduga inkubacija
- Previsoka temperatura inkubacije
- Ranije oštećenje limfocita (negativna kontrola je pozitivna = „background“)
- Nije dodat fiksativ

Zečji komplement

Rekonstituišite liofilizirani komplement sa 1 ml ili 5 ml destilovane vode (shodno veličini pakovanja). Rekonstituisanje traje 10 - 15 minuta. Rekonstituisani komplement se mora čuvati na hladnom (2 - 8°C) i iskoristiti u roku od 3 - 4 sata.

NEMOJTE ZAMRZAVATI rastvoren zečji komplement!

Performanse

Podaci o dijagnostičkoj senzitivnosti i specifičnosti (R-vrednost) mogu se videti u listingu rezultata testa HISTO TRAY

Literatura

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

Mere predostrožnosti

HISTO TRAY ploče i zečji komplement dizajnirani su za primenu u in vitro dijagnostici i treba da ih koristi adekvatno obučeno osoblje, iskusno u testovima histokompatibilnosti. Treba da se prate vodiči za transplantaciju kao i EFI standard, naročito u slučaju sumnjivih rezultata. Materijal humanog porekla koji je korišćen u proizvodnji ovih reagenasa pokazao se negativnim pri testiranju na HBsAg i HIV i HCV antitela. Bez obzira na to, sve biološke materijale koji se koriste, kao što su krv, serum i kontrolni serumi, treba smatrati potencijalno infektivnim, jer ni jedan metod testiranja ne može garantovati da je materijal poreklom iz bioloških izvora lišen infektivnih agenasa. Prilikom rada sa biološkim materijalom, preporučuju se prigodne mere predostrožnosti (ne pipetirajte ustima; prilikom rada sa biološkim materijalom i izvođenja testa koristite rukavice za jednokratnu upotrebu; kad završite testiranje dezinfikujte ruke).

Biološki materijal pre odbacivanja treba inaktivirati (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 je prosut sadržaj uklanja, uključujući rukavice, pre bacanja treba inaktivirati (npr. u autoklavu).

Anti-HLA serumi sadrže NaN_3 kao konzervans. Reagens sadrži < 0.1% NaN_3 što se ne smatra štetnom koncentracijom. Ipak izbegavajte da dođe u kontakt sa kožom i sluznicama. U nekim vodoinstalacionim cevima mogu biti prisutni bakar i olovo koji sa azidima mogu reagovati i formirati eksplozivne soli. Količina azida korišćena u reagensima je mala; ipak, kada se bacaju materijali koji sadrže azide, treba ih isprati velikim količinama vode.

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

Za quenching rastvor, rastvor formaldehida i akridinoranž / etidijum bromid (AO/EB) pratite uputstva i mere predostrožnosti proizvođača.

Žuta boja anti-HLA seruma koja ostaje i nakon otapanja može ukazati na promenu pH vrednosti. Ovakve ploče **ne** treba koristiti u testiranju.

Material Safety Data Sheets su dostupni na zahtev.

Nemojte koristiti **HISTO TRAY ploče i zečji komplement** nakon isteka roka trajanja označenog na etiketi.

Konzervans:

< 0.1% NaN_3

Čuvanje:





≤ -20°C

Rok trajanja

do isteka roka trajanja navedenog na etiketi

Pakovanje / tipizacija:

prema informacijama naznačenom na kitu

Objašnjenje simbola na etiketama			
	temperatura čuvanja		dovoljno za n testova
	koristiti do		konsultovati uputstvo za upotrebu
ANTI-HLA-SERA	anti HLA serum	LOT	broj šarže
COMPLEMENT RAB	zečji komplement	LYOPH	liofilizirano
CONT	sadržaj, sadrži	MICROTESTTRAY	mikrotitarske ploče sa unapred razlivenim antiserumima i kontrolama
CONTROL +	pozitivna kontrola	MONOCL	monoklonsko
CONTROL -	negativna kontrola	OR	ili
HLA TYPING	namenjeno primeni u HLA tipizaciji	POLYCL	poliklonsko
HUM	poreklo: humano	REF	kataloški broj
IFU	uputstvo za upotrebu	WORKSHEET	radna lista
IVD	za in vitro dijagnostiku		

Verzija 1/2012

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