

HISTO TRAY HLA Klasse I

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-healthcare.com

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			

Produktbeschreibung

Die **HISTO TRAY** Kits enthalten Mikrottestplatten mit vorgetropften Anti-HLA-Seren und Kontrollen. Kaninchenkomplement, Worksheets zur Auswertung und Ergebnislisten sind beigelegt.

Die **HISTO TRAY AB-** und **-ABC Kits** dienen zur serologischen Gewebetypisierung der HLA-Klasse I Antigene. Die **HISTO TRAY B27 Kits** werden zum Nachweis von HLA-B27 eingesetzt. Die Assoziation von HLA-B27 mit dem Krankheitsbild der seronegativen Arthritiden (Morbus Bechterew, Morbus Reiter, reaktive Arthritiden) wird zur Unterstützung der Diagnostik dieser Krankheiten genutzt.

Testprinzip

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

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

1. Zur Steigerung der Zellausbeute 4 ml heparinisieretes (50 IE/ml) Blut mit 4 ml Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, verdünnen.
2. 4 - 5 ml Zelltrennmedium, z.B. HISTOPREP, in ein Zentrifugenröhrchen (12 ml) geben.
3. Ca. 6 ml verdünntes Blut mit einer Pasteurpipette am Innenrand des Röhrchens vorsichtig auf den Gradienten schichten.
4. 15 Minuten bei 1.200 x g und einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) zentrifugieren. Zentrifuge ungebremst auslaufen lassen.
5. Mit einer Pasteurpipette den Lymphozytenring (Interphase) abheben und in ein neues Zentrifugenröhrchen geben.
6. Zum Waschen der Lymphozyten mit Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, auffüllen und 10 Minuten bei 550 x g zentrifugieren; Überstand verwerfen; Sediment resuspendieren und mit Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, auffüllen.
7. 10 Minuten bei 230 x g zentrifugieren; Überstand verwerfen, Sediment resuspendieren und mit Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, auffüllen.
8. Nochmals 10 Minuten bei 110 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
9. Sediment in Zellkulturmedium, z.B. RPMI 1640, so resuspendieren, dass eine Endkonzentration von 2000 - 3000 Lymphozyten pro µl vorliegt (Neubauer-Zählkammer oder Zellcounter).

Testdurchführung NIH-Test

1. HISTO TRAY-Platten auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
2. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl Lymphozytensuspension (2.000 - 3.000 Zellen) geben.
Um eine korrekte Antigen-Antikörperreaktion zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich Zellen und Antiserum verbinden.
3. 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
4. 5 - 6 µl Kaninchenkomplement zugeben.
5. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
6. 3 - 4 µl Eosin-Lösung (5% wässrig) (Softtouchmethode) zugeben und 5 - 10 Minuten inkubieren.
7. Mit 5 - 6 µl Formaldehyd-Lösung (37%; pH 7,2) fixieren (Softtouchmethode) und mindestens 60 Minuten stehenlassen.
8. Zur besseren Beurteilung kurz vor dem Mikroskopieren ein Deckgläschen auflegen und mit inversem Phasenkontrastmikroskop auswerten.

Testdurchführung - Isolierung von T-Lymphozyten mit der Immunobeads-Technik

Die Isolierung der T-Lymphozyten mit der Immunobeads-Technik und die zur Färbung und Fixation benötigten Reagenzien sind den Gebrauchsinformationen des Herstellers zu entnehmen.

Testdurchführung - Immunobeads-Technik (IMB)

1. HISTO TRAY-Platten auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
2. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl IMB-T-Lymphozytensuspension (ca. 1.000 Zellen) geben.
Um eine korrekte Antigen-Antikörperreaktion zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich Zellen und Antiserum verbinden.
3. 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
4. 5 µl Kaninchenkomplement Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) zugeben (1.000 µl Kaninchenkomplement + 20 µl AO/EB).
5. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) im Dunkeln inkubieren.
6. 5 µl EDTA-/Quenching-Lösung zugeben (2.000 µl Quenching-Lösung + 1.000 µl EDTA 8% wässrig).
7. 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
- 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 Inkubationstemperaturen

Ursache falsch positiver Reaktionen

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

Kaninchenkomplement

Lyophilisiertes Kaninchenkomplement kurz vor Gebrauch mit 1 ml Aqua dest. rehydrieren. 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 zu entnehmen.

Literatur

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

Warn- und Entsorgungshinweise

HISTO TRAY-Platten und Kaninchenkomplement 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).

Anti-HLA-Seren enthalten NaN₃ als Konservierungsmittel. Die in den Reagenzien enthaltene Konzentration von < 0,1% NaN₃ gilt nicht 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 in den Reagenzien 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 Quenching-Lösung, Formaldehyd-Lösung und Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) sollten die Warn- und Entsorgungshinweise des Herstellers 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-Platten und Kaninchenkomplement 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 / Typisierungen:

gemäß Angaben auf dem Kit

Erklärung der Symbole auf den Etiketten			
	verwendbar bis		Gebrauchsinformation beachten
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert		ausreichend für n Tests
ANTI-HLA-SERA	Anti-HLA-Seren		Hersteller
COMPLEMENT RAB	Kaninchenkomplement	LOT	Lot-Nummer
CONT	Inhalt, enthält	LYOPH	lyophilisiert
CONTROL -	Negative Kontrolle	MICROTESTTRAY	Mikrotestkammer mit vorgetropften Antiseren und Kontrollen
CONTROL +	Positive Kontrolle	MONOCL	monoklonal
HLA TYPING	Zweckbestimmung: HLA-Typisierung	OR	oder
HUM	Ursprung: human	POLYCL	polyklonal
IFU	Gebrauchsinformation	REF	Bestell-Nummer
IVD	In-vitro-Diagnostikum	WORKSHEET	Auswertungsbogen

Version: 4 / 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

EN

INSTRUCTIONS FOR USE

HISTO TRAY
HLA Class I

CE₀₁₂₃
IVD

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

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			

Description of Product

HISTO TRAY kits contain microplates with predropped anti-HLA sera and controls. Rabbit complement, worksheets for evaluation and the listing of test results are enclosed. The intended use of **HISTO TRAY AB-** and **-ABC kits** is the serological tissue typing of HLA class I antigens. The **HISTO TRAY B27 kits** are used for the determination of HLA-B27. Based on significant associations between HLA-B27 and a group of diseases summarized as seronegative arthritis (Bechterew's disease, Reiter's disease, reactive arthritis) the evidence of this antigen will be used to support the diagnosis of these diseases.

Test Principle

HLA-antisera react with the corresponding 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.

Test Procedure - Isolation of Lymphocytes from e.g. Heparinized Blood

- In order to increase the cell yield, dilute 4 ml of heparinized blood (50 I.U./ml) with 4 ml of cell culture medium (e.g. RPMI 1640).
- Pipet 4 - 5 ml of cell separation medium, e.g. HISTOPREP, into a centrifuge tube (12 ml).
- Carefully add app. 6 ml of diluted blood with a Pasteur pipette to the gradient alongside the inner edge of the tube.
- Centrifuge 15 minutes at 1200 x g and a temperature of 18...22°C (room temperature). Phase out centrifugation without using brake function.
- Take off the lymphocyte ring (interphase) using a Pasteur pipette and pipet it into a new centrifuge tube.
- For lymphocyte washing, fill it up with cell culture medium, e.g. RPMI 1640, and centrifuge for 10 minutes at 550 x g. Discard the supernatant, resuspend the sediment and fill it up with cell culture medium, e.g. RPMI 1640.
- Centrifuge for 10 minutes at 230 x g, discard the supernatant, resuspend the bottom sediment and fill it up with cell culture medium, e.g. RPMI 1640.
- Centrifuge for 10 minutes at 110 x g and discard the supernatant.
- Resuspend the sediment in cell culture medium, e.g. RPMI 1640, and adjust to a final concentration of 2000 - 3000 lymphocytes per µl (Neubauer count chamber or cell counter).

Test Procedure – NIH Technique

- Bring the HISTO TRAY plates to a temperature of 18...22°C (room temperature).
- Place 1 µl lymphocyte suspension (2.000 - 3.000 cells) into each predropped well.
In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
- Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 30 minutes.
- Add 5 - 6 µl rabbit complement.
- Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 60 minutes.
- Add 3 - 4 µl Eosin solution (5% aqueous) (soft touch method) and incubate for 5 - 10 minutes.
- Fix with 5 - 6 µl Formaldehyde solution (37%, pH 7.2) (soft touch method). Allow sedimentation of cells at least 60 minutes.
- Cover the tray with a cover glass shortly before reading under an inverse phase contrast microscope.

Test Procedure - Isolation of T-lymphocytes with the Immunobeads Technique

Please refer to the manufacturer's instructions

- when using the Immunobeads (IMB) technique for isolation of the T-lymphocytes
- regarding the reagents needed for staining and fixation

Test procedure - Immunobeads (IMB) Technique

- Bring the HISTO TRAY plates to a temperature of 18...22°C (room temperature).
- Place 1 µl IMB-T-lymphocyte suspension (app.1.000 cells) into each predropped well.
In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
- Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 30 minutes.
- Add 5 µl rabbit complement Acridinorange/Ethidiumbromide (AO/EB) (1.000 µl rabbit complement + 20 µl AO/EB).
- Incubate for 60 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature) in darkness.
- Add 5 µl EDTA-/quenching-solution (2.000 µl quenching solution + 1.000 µl EDTA 8% aqueous).
- Read HISTO TRAY plates 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		Score	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	evaluation not 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
- 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 times were too short
- Incubation temperatures were too low

Causes of false positive reactions

- Cross reactions
- Incubation times were too long
- Incubation temperatures were too high
- Prior damage of lymphocytes (negative control is positive = „background“)
- Failure to add fixative

Rabbit Complement

Reconstitute lyophilized complement with 1 ml aqua dest.. 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 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 plates and rabbit complement 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, especially in the particular case of doubtful typing 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 NaN₃ as a preservative. The reagents contain < 0.1% NaN₃ which 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 reagents 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 quenching solution, Formaldehyde solution and Acridinorange / Ethidiumbromide (AO/EB) please adhere to the warnings and precautions of the manufacturer.

A yellow colouration of anti-HLA sera which still remains after thawing is indicating a change of the pH value. Those plates should **not** be used for the test.

Do not use **HISTO TRAY plates and rabbit complement** 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 / typings:** according to information indicated on the kit

Explanation of symbols used on Labelling			
	use by		Consult Instructions for use
	Storage temperature / Lower limit of temperature		sufficient for n tests
ANTI-HLA-SERA	anti-HLA-Sera		Manufacturer
COMPLEMENT RAB	rabbit complement	LOT	Batch code
CONT	content, contains	LYOPH	lyophilised
CONTROL -	negative Control	MICROTESTTRAY	Microtest tray with predropped antisera and controls
CONTROL +	positive Control	MONOCL	monoclonal
HLA TYPING	Intended purpose: HLA-typing	OR	or
HUM	Origin: human	POLYCL	polyclonal
IFU	Instructions for use	REF	Catalogue number
IVD	For in vitro diagnostic use	WORKSHEET	Worksheet

Version: 4 / 2018 | Issue: 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