

DE**GEBRAUCHSINFORMATION****HISTO TRAY
HLA Klasse II**Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-healthcare.com**HISTO TRAY DR 72 (10) REF 7029****Produktbeschreibung**

HISTO TRAY DR 72 dient zur serologischen Gewebetypisierung der HLA-Klasse II Antigene. Das HISTO TRAY DR 72 Kit enthält Mikrottestplatten mit vorgetropften Anti-HLA-Seren und Kontrollen sowie Kaninchenkomplement. Je Kavität sind 1 µl Anti-HLA-Serum und ca. 5 µl Paraffinöl vorgelegt. Zusätzlich zu der HLA-Negativ- und HLA-Positivkontrolle enthält jede HISTO TRAY DR 72-Platte eine Anti-B-Lymphozyten-Kontrolle und eine Anti-T-Lymphozyten-Kontrolle zur Überprüfung der Zelltrennung. Worksheets zur Auswertung und Ergebnislisten sind beigelegt.

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).

Isolierung von B-Lymphozyten aus z.B. heparinisierem Blut

Die Isolierung der B-Lymphozyten mit der Immunobeads (IMB)-Technik oder der Immunorosettierungsmethode und die zur Färbung und Fixation benötigten Reagenzien sind den Gebrauchsinformationen des Herstellers zu entnehmen.

Kaninchenkomplement

Lyophilisiertes Kaninchenkomplement kurz vor Gebrauch mit 1 ml Aqua dest. auflösen. 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!

Testdurchführung

1. Zellisolierung mit der IMB-Technik oder Immunorosettierungsmethode.
2. HISTO TRAY-Platten auf eine Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) bringen.
3. In jede vorgetropfte Kavität 1 µl B-Lymphozytensuspension geben (ca. 1.000 Zellen bei Isolierung mit der IMB-Technik, ca. 1000 – 2000 Zellen bei der Isolierung mit der Immunorosettierungsmethode).
Um eine korrekte Antigen-Antikörperreaktion zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass sich Zellen und Antiserum verbinden.
4. 30 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
5. 5 µl Kaninchenkomplement zugeben.
6. 60 Minuten bei einer Temperatur von 18...22°C (Raumtemperatur) inkubieren.
7. 5 µl Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB)- / Quenching-Lösung zugeben.
8. HISTO TRAY-Platten 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 oder Monozyten
- 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

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).

Die Anti-HLA-Seren enthalten < 0,1% NaN₃ als Konservierungsmittel. In der Konzentration von < 0,1% gilt NaN₃ nicht mehr als gesundheitsschädlich, trotzdem sollte ein Kontakt mit der Haut und Schleimhäuten vermieden werden. Kupfer und Blei, die in einigen Rohsystemen 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 Acridinorange/Ethidiumbromid (AO/EB) und Quenching-Lösung 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 dürfen **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: 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 5/2018 | 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 II****CE₀₁₂₃
IVD**Electronic Instructions for Use see www.bag-healthcare.com**HISTO TRAY DR 72 (10)****REF 7029****Description of Product**

The intended use of HISTO TRAY DR 72 is the serological tissue typing of HLA class II antigens. HISTO TRAY DR 72 contains microplates with predropped anti-HLA sera and controls as well as rabbit complement. Each well contains 1 µl anti-HLA serum and approx. 5 µl paraffin oil. In addition to the HLA negative and positive control every HISTO TRAY DR 72 plate contains an anti-B-lymphocyte control and an anti-T-lymphocyte control as an indicator of the purity of the cell isolation. Worksheets for evaluation and the listing of test results are enclosed.

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.

Isolation of B-Lymphocytes from e.g. Heparinized Blood

Please refer to the manufacturer's instructions

- when using the Immunobeads (IMB) technique or Immunorosettes method for isolation of the B-lymphocytes
- regarding the reagents needed for staining and fixation

Rabbit Complement

Dissolve 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!

Test Procedure

1. Isolate cells with IMB technique or Immunorosettes method.
2. Bring the HISTO TRAY plates to a temperature of 18...22°C (room temperature).
3. Place 1 µl B-lymphocyte suspension into each predropped well.
Approximately 1000 cells if IMB technique was used for isolation, approximately 1000 – 2000 cells if Immunorosettes method was used for isolation.
In order to guarantee sufficient antigen-antibody reaction it is necessary that antiserum and cells touch each other.
4. Incubate at a temperature of 18...22°C (room temperature) for 30 minutes.
5. Add 5 µl rabbit complement.
6. Incubate for 60 minutes at a temperature of 18...22°C (room temperature).
7. Add 5 µl Acridinorange/Ethidiumbromide (AO/EB) / Quenching solution.
8. 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		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 or monocyte 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

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 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 as preservative < 0.1% NaN₃. A concentration of < 0.1% NaN₃ 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 Acridinorange/Ethidiumbromide (AO/EB) / Quenching solution 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 may **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: 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: 5 / 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