

**DE**

## GEBRAUCHSINFORMATION

### HISTO TRAY Complement ABC

**CE**0123Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)**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 beigelegt.

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.

<b>% lysierte Zellen</b>	<b>Bewertung</b>
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 Prozonophänomene 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**

Für die Qualitätskontrolle wird HISTO TRAY Complement ABC mit mindestens 4 Chargen Kaninchenkomplement getestet, wobei die unverdünnten Antiseren mit den korrespondierenden Antigenen mindestens bei einer Komplementverdünnung von 1:2 eindeutig positiv reagieren.

**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. Transplantationsrichtlinien 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  $\text{NaN}_3$  als Konservierungsmittel. In der enthaltenen Konzentration von  $< 0,1\%$  gilt  $\text{NaN}_3$  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, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der regionalen Behörden erfolgen.

Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.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:**  $< 0,1\% \text{NaN}_3$

**Haltbarkeit:** bis zum aufgedruckten Datum auf den Etiketten

**Lagerung:**  $\leq -20^\circ\text{C}$

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

Version 4/2019 / Stand: 2019-06