

IT ISTRUZIONI PER L'USO

Anti-HLA Negative Control	REF	61099
Anti-HLA Positive Control	REF	61098
Anti-HLA Positive Control B-Cell	REF	5931
Anti-HLA Positive Control T-Cell	REF	5930



Test di microinfocitotossicità (NIH) PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Descrizione del prodotto

Anti-HLA Positive Control consiste di una immunoglobulina anti-linfociti umani (IgG) ottenuta da coniglio, insieme ad antisieri umani HLA polispecifici.

Anti-HLA Negative Control consiste di un pool di sieri da diversi donatori di gruppo sanguigno AB, che non mostrano anticorpi HLA.

Anti-HLA Positive Control ed Anti-HLA Negative Control vengono impiegati come sieri di controllo nel test di microinfocitotossicità per la diagnostica in vitro di antigeni / anticorpi umani HLA di Classe I o II.

Anti-HLA Positive Control B-Cell e T-Cell vengono impiegati nei test di linfocitotossicità per verificare la purezza delle cellule B e T isolate.

I controlli Anti-HLA sono liofilizzati. Prima dell'uso sciogliere i sieri di controllo Anti-HLA liofilizzati nel volume di acqua distillata indicato sull'etichetta. La ricostituzione impiega 10-15 minuti.

Principio del test

Gli antisieri HLA reagiscono con il corrispondente antigene legato alla membrana dei linfociti umani. L'aggiunta di complemento di coniglio determina un cambiamento strutturale della membrana cellulare che conduce a una penetrazione del colorante indicatore. Linfociti colorati indicano quindi reazione positiva. In caso di reazione antigene-anticorpo assente, la membrana cellulare resterà intatta, non ci sarà quindi alcuna penetrazione di colorante indicatore, e la cellula resterà non colorata, indicando una reazione negativa.

Isolamento di linfociti

L'isolamento dei linfociti deve avvenire seguendo le istruzioni del produttore, ed utilizza una gradiente di densità o un metodo di immuno beads (IMB).

Procedura del test – Microinfocitotossicità (Class I)

1. Riempire i micropozzetti con circa 5 - 10 µl di olio minerale.
2. Pipettare 1 µl di siero Anti-HLA all'interno di ogni pozzetto e sotto l'olio, avvalendosi di una microsiringa. Aggiungere 1 µl di sospensione linfocitaria (circa 2000-3000 cellule) sempre sotto l'olio. Affinchè si ottenga una reazione antigene-anticorpo significativa è necessario che antisiero e cellule entrino in contatto tra loro.
3. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (18...22°C).
4. Aggiungere 5 - 6 µl di complemento di coniglio ad ogni pozzetto ed incubare per 60 minuti a una temperatura di 18...22°C (temperatura ambiente) (reazione citolitica).
5. Aggiungere 3 - 4 µl di soluzione di eosina (acquosa al 5%) ad ogni micropozzetto e dopo 5 -10 minuti con 5 - 6 µl di una soluzione di formaldeide (37%) (colorazione e fissazione).
6. Dopo sedimentazione dei linfociti (30 - 60 min.) effettuare la lettura della piastra di micropozzetti utilizzando un microscopio a fase inversa. Coprire la piastra poco prima della lettura con un vetrino.

Procedura del test – metodica IMB (Class II)

1. Riempire i micropozzetti con circa 5 - 10 µl di olio minerale.
2. Pipettare 1 µl di siero Anti-HLA all'interno di ogni pozzetto e sotto l'olio, avvalendosi di una microsiringa. Aggiungere 1 µl di sospensione linfocitaria IMB-B (circa 1000 cellule) sempre sotto l'olio. Affinchè si ottenga una reazione antigene-anticorpo significativa è necessario che antisiero e cellule entrino in contatto tra loro.
3. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (18...22°C).
4. Aggiungere 5 µl di complemento di coniglio. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (18...22°C).
5. Aggiungere 5 µl di soluzione arancio d'acridina/etidio bromuro/EDTA.
6. Leggere con un microscopio a fluorescenza.

Caratteristiche delle prestazioni

I sieri Anti-HLA-Positive Control vengono testati in controlli di qualità con almeno 50 sospensioni di linfociti T e B provenienti da diversi donatori e reagiscono secondo le specifiche con uno score 8.

I sieri Anti-HLA Negative control vengono testati in controlli di qualità con almeno 50 sospensioni di linfociti T e B provenienti da diversi donatori e reagiscono secondo le specifiche con uno score massimo pari a 2.

Problemi e soluzioni

Cause di reazioni false negative o deboli

- La valutazione al microscopio può essere resa difficoltosa dalla contaminazione con eritrociti
- Contaminazione con piastrine
- Quantità di linfociti troppo elevata
- Antisiero HLA di colore giallo
- I sieri sono stati congelati e scongelati troppo frequentemente
- Complemento costituito mantenuto troppo a lungo a temperatura ambiente prima dell'uso
- Il complemento residuo è stato congelato e riutilizzato dopo scongelamento
- Tempo d'incubazione troppo breve
- Temperatura di incubazione troppo bassa

Cause di reazioni false positive

- Tempo d'incubazione troppo lungo
- Temperatura di incubazione troppo bassa
- Linfociti danneggiati dopo estrazione (controllo negativo positivo = „background“)
- Mancata aggiunta di fissativo
- Trascinamento durante il pipettamento

Limitazioni della metodica

Anti-HLA Positive Control è sconsigliato per l'utilizzo con DTT (ditiotreitolo). Potrebbero verificarsi reazioni false negative, poiché gli anticorpi monoclonali di coniglio presenti nel controllo si comportano diversamente dagli anticorpi IgG umani quando trattati con DTT.

Bibliografia

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

Avvertenze e precauzioni

I sieri **Anti-HLA-Control** sono stati sviluppati per uso diagnostico in vitro e dovrebbe essere utilizzato da personale adeguatamente addestrato nel campo degli studi di istocompatibilità. Si raccomanda di seguire le linee guida per i trapianti e gli standard EFI, in particolare nel caso di risultati di tipizzazione incerti. Il materiale umano utilizzato per la produzione di questi reagenti è stato testato per la ricerca di antigeni epatite B ed anticorpi HIV ed HCV. Nonostante ciò tutti i materiali biologici usati come sangue, sieri e sieri di controllo dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente infetti, perché non si può garantire che il materiale di origine biologica sia esente da agenti infettivi. Quando si maneggia materiale biologico si raccomandano appropriate precauzioni di sicurezza (non pipettare con la bocca, indossare i guanti mentre si maneggia materiale biologico e si esegue il test, disinfettare le mani al termine del test).

Il materiale biologico dovrebbe essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave). Il materiale monouso dovrebbe essere autoclavato o incenerito dopo l'uso. La fuoriuscita di materiale potenzialmente infetto dovrebbe essere rimosso immediatamente con carta assorbente e le aree contaminate pulite con un disinfettante standard o con etanolo al 70%. Il materiale usato per pulire, inclusi i guanti, dovrebbe essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave).

I reagenti del test contengono NaN_3 come conservante. Evitare di inalare o ingerire o di mettere in contatto con la pelle e le mucose (si vedano le frasi H e P sotto indicate). Inoltre piombo e rame utilizzati in alcune tubature possono reagire con le azidi causando sali esplosivi. Le quantità di azide contenute in questi reagenti sono minime; ciò nonostante durante lo smaltimento di materiali contenenti azide si consiglia di smaltire facendo scorrere abbondante acqua. Lo smaltimento di tutti i campioni e materiali utilizzati per eseguire i test dovrebbero essere smaltiti secondo le leggi nazionali e/o locali. Per le soluzioni contenenti formaldeide ed arancio d'acridina / etidio bromuro si raccomanda di seguire le avvertenze del produttore.

Frasi H e P (per sieri anti-HLA non diluiti)

H302	Nocivo se ingerito.
H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P101	In caso di consultazione di un medico, tenere a disposizione il contenitore o l'etichetta del prodotto.
P102	Tenere fuori dalla portata dei bambini.
P264	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P270	Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P301+P312	IN CASO DI INGESTIONE: In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P330	Sciacquare la bocca.
P501	Smaltire il prodotto/recipiente in apposito contenitore per rifiuti speciali.

Le schede di sicurezza (MSDS) sono disponibili sul sito www.baghealthcare.com.

Non utilizzare i sieri **Anti-HLA-Control** oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Conservante:

< 1% NaN_3 (liofilizzato), avvertenza  ; < 0.1% NaN_3 (in soluzione)

Durata:


- in forma liofilizzata sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta
- in soluzione: 3 mesi

Stoccaggio:

2...8°C, sciogliere e mantenere a $\leq -20^\circ\text{C}$

Confezionamento:

0.5 ml, umano o monoclonale, liofilizzato

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette			
	Temperatura di stoccaggio		Test di linfocitossicità secondo linee guida NIH
	Utilizzare entro		Consultare le istruzioni d'uso
	Seri anti-HLA		Per uso diagnostico in vitro
	Codice prodotto		Codice lotto
	Origine: umana		Liofilizzato

Per le istruzioni d'uso in altra lingua consultare il sito <http://www.bag-healthcare.com> o telefonare +49 (0)6404-925-125

Versione 2/2015-05



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