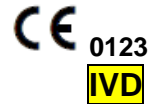


## HISTO TRAY HLA Class I



### PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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			

#### Descrizione del prodotto

I kit **HISTO TRAY** contengono micropiastre con sieri anti-HLA predispensati e relativi controlli. Sono inclusi il complemento di coniglio, i fogli di lavoro per l'interpretazione e l'elenco dei risultati test. La destinazione d'uso dei kit **HISTO TRAY AB-** ed **ABC-** è la tipizzazione tissutale degli antigeni HLA di classe I. I kit **HISTO TRAY B27** sono impiegati per la determinazione dell'HLA-B27. Sulla base delle associazioni significative descritte tra l'HLA-B27 e un gruppo di patologie descritte nel complesso come artriti seronegative (sindrome di Bechterew, di Reiter, artrite reattiva) la presenza di questo antigene viene impiegata per adiuvarne la diagnosi di queste malattie.

#### Principio del test

Gli antisieri anti-HLA reagiscono con i corrispondenti antigeni di membrana dei linfociti umani; l'aggiunta del complemento di coniglio porta ad una modifica strutturale della membrana cellulare che diventa permeabile ad un colorante indicatore: linfociti colorati = reazione positiva. In caso di una mancata reazione antigene-anticorpo la membrana cellulare rimane intatta, non penetra il colorante indicatore e le cellule non si colorano = reazione negativa.

#### Procedura del test – Isolamento di linfociti da per es. sangue eparinizzato

1. Per aumentare la resa, diluire 4 ml di sangue in eparina (50 U.I.) con 4 ml di terreno di coltura (per es. RPMI 1640).
2. Pipettare 4-5 ml di reagente per l'isolamento delle cellule, per es. HISTOPREP, in una provetta da centrifuga (12 ml).
3. Con una pipetta Pasteur depositare delicatamente 6 ml di sangue diluito sul gradiente facendolo scivolare lungo la parete interna della provetta.
4. Centrifugare 15 minuti a 1200 x g alla temperatura di 18-22° C. Centrifugare senza freno.
5. Prelevare l'anello dei linfociti (interfase) usando una pipetta Pasteur e trasferirlo in una nuova provetta da centrifuga.
6. Per il lavaggio dei linfociti riempire la provetta con il terreno di coltura, per es. RPMI 1640, e centrifugare per 10 minuti a 550 x g. Eliminare il supernatante e risospendere il sedimento con il terreno di coltura, per es. RPMI 1640, riempiendo la provetta.
7. Centrifugare per 10 minuti a 230 x g, eliminare il supernatante e risospendere il sedimento con il terreno di coltura, per es. RPMI 1640, riempiendo la provetta.
8. Centrifugare per 10 minuti a 110 x g ed eliminare il supernatante.
9. Risospendere il sedimento nel terreno di coltura, per es. RPMI 1640, aggiustando il volume per avere una concentrazione finale di 2000-3000 linfociti per µl (conta delle cellule nella camera di Neubauer o contatore automatico).

#### Procedura del test – Tecnica NIH

1. Portare le piastre HISTO TRAY alla temperatura di 18-22° C (temperatura ambiente).
2. Mettere 1 µl di sospensione linfocitaria (2000 – 3000 cellule) in ogni pozzetto preseminato. Per garantire una reazione sufficiente antigene-anticorpo è necessario che l'antisiero e le cellule vengano a contatto.
3. Incubare alla temperatura di 18-22° C (temperatura ambiente) per 30 minuti.
4. Aggiungere 5 – 6 µl di complemento di coniglio.
5. Incubare alla temperatura di 18-22° C (temperatura ambiente) per 60 minuti.
6. Aggiungere 3 – 4 µl di eosina, soluzione acquosa 5% (soft touch method), ed incubare per 5 – 10 minuti.
7. Fissare con 5 – 6 µl di formaldeide, soluzione 37% pH 7,2 (soft touch method). Lasciare a sedimentare le cellule almeno 60 minuti
8. Coprire brevemente la micropiastre con un coperchio di vetro prima della lettura sotto ad un microscopio invertito.

#### Procedura del test – Isolamento dei linfociti-T da per es. sangue eparinizzato

Isolamento dei linfociti T usando il metodo Immuno Beads così come la colorazione ed il fissaggio in base alle istruzioni del produttore.

#### Procedura del test – Metodo Immuno Beads (IMB)

1. Portare le piastre HISTO TRAY alla temperatura di 18-22° C (temperatura ambiente).
2. Mettere 1 µl di sospensione di linfociti T (1000 cellule) in ogni pozzetto preseminato. Per garantire una reazione sufficiente antigene-anticorpo è necessario che l'antisiero e le cellule vengano a contatto.
3. Incubare alla temperatura di 18-22° C (temperatura ambiente) per 30 minuti.
4. Aggiungere 5 µl di complemento di coniglio-arancio di acridina/etidio bromuro (1000 µl di complemento di coniglio + 20 µl colorante) in ciascun pozzetto.
5. Incubare per 60 minuti alla temperatura di 18-22° C (temperatura ambiente) al buio.
6. Aggiungere 5 µl EDTA-quenching solution (1000 µl sol. acquosa 8% EDTA + 2000 µl quenching solution).
7. Leggere le HISTO TRAY con un microscopio a fluorescenza.

#### Valutazione dei risultati

La quantità dei linfociti lisati rispetto alla quantità totale dei linfociti è valutato con uno score in ogni pozzetto.

% cellule lisate	=	Score	Valutazione
0 – 19%	=	Score 1	negativo
20 – 39%	=	Score 2	incerto negativo
40 – 59%	=	Score 4	debole positivo
60 – 79%	=	Score 6	positivo
80 – 100%	=	Score 8	forte positivo
	=	Score 0	valutazione impossibile

#### Soluzione dei problemi

##### **Cause di reazioni deboli o false negative**

- La contaminazione degli eritrociti può rendere difficile la valutazione al microscopio.

- Contaminazione delle piastrine.
- Quantità dei linfociti troppo alta.
- Sieri anti-HLA di colore giallo.
- Le piastrine sono state scongelate e ricongelate.
- Il complemento ricostituito è stato tenuto troppo a lungo a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Il complemento avanzato è stato congelato e scongelato nuovamente.
- I tempi di incubazione erano troppo brevi.
- La temperatura di incubazione era troppo bassa.

**Cause di reazione false positive**

- Cross reazioni.
- I tempi di incubazione erano troppo lunghi.
- La temperatura di incubazione era troppo alta.
- Linfociti danneggiati (il controllo negativo risulta essere positivo = forte background).
- Fallimento nell'aggiunta del fissante.

**Complemento di coniglio**

Sciogliere il complemento liofilizzato con 1 ml di acqua deionizzata. La ricostituzione impiega 10-15 minuti. Il complemento ricostituito deve essere conservato al fresco (2-8° C) e usato entro 3-4 ore.

**NON CONGELARE** il complemento di coniglio ricostituito

**Caratteristiche dell'esecuzione**

Guardare l'elenco risultati HISTO TRAY per ottenere dati per la sensibilità e la specificità dei diagnostici (R-value).

**Letteratura**

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

**Avvertenze e precauzioni**

Le **piastre HISTO TRAY** e il **complemento di coniglio** sono prodotti per solo uso diagnostico e dovrebbero essere utilizzati da personale debitamente addestrato con esperienza in istocompatibilità. Dovrebbero essere seguite le linee guida dei trapianti così come gli standard EFI, in particolare modo nei casi di risultati dubbi. Il materiale di origine umana usato per produrre questi reagenti è stato testato ed è risultato negativo per gli anticorpi HBsAg, HIV e 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 materiali biologici dovrebbero essere inattivati prima dello smaltimento (per es. in autoclave). Il materiale smaltito dovrebbe essere autoclavato o incenerito dopo l'uso.

I sieri anti-HLA contengono come conservante NaN<sub>3</sub>. NaN<sub>3</sub> è nocivo se inalato, ingerito o a contatto con la pelle e le mucose. Il reagente contiene <0,1% NaN<sub>3</sub>, concentrazione che non è considerata dannosa. Il rame e il piombo presenti in alcune tubazioni dell'acqua possono reagire con NaN<sub>3</sub> e formare sali esplosivi. Le quantità di NaN<sub>3</sub> in questo reagente è minima; nonostante ciò quando si utilizzano materiali di questo tipo, dovrebbero essere lavati via con grossi volumi di acqua.

Tutti i campioni e il materiale usato per eseguire i test dovrebbero essere smaltiti secondo le leggi nazionali e locali.





Per la quenching solution e arancio di acridina/etidio bromuro (AO/EB) vedere le avvertenze e le precauzioni d'uso del produttore.

Una colorazione gialla dei sieri anti-HLA anche dopo lo scongelamento, può indicare una variazione del valore di pH. Queste piastrine non dovrebbero essere usate per il test.

Non usare le **HISTO TRAY** e il **complemento di coniglio** oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

- Conservante:** < 0.1% NaN<sub>3</sub>a
- Conservazione:** ≤ - 20°C
- Scadenza:** fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta
- Confezionamento:** in base alle informazioni indicate sulla confezione

**Spiegazione dei simboli usati sulle etichette**

	Utilizzare entro		Consultare le istruzioni per l'uso
	Temperatura di conservazione		Sufficiente per n test
<b>ANTI-HLA-SERA</b>	Sieri anti-HLA	<b>LOT</b>	Codice lotto
<b>COMPLEMENT RAB</b>	Complemento di coniglio	<b>LYOPH</b>	liofilizzato
<b>CONT</b>	contiene	<b>MICROTESTTRAY</b>	Camere microtest con antisieri e controlli predispensati
<b>CONTROL -</b>	Controllo negativo	<b>MONOCL</b>	monoclonale
<b>CONTROL +</b>	Controllo positivo	<b>OR</b>	o
<b>HLA TYPING</b>	Destinazione d'uso: tipizzazione HLA	<b>POLYCL</b>	policlonale
<b>HUM</b>	Origine: umana	<b>REF</b>	Codice prodotto
<b>IFU</b>	Istruzioni per l'uso	<b>WORKSHEET</b>	Foglio di lavoro
<b>IVD</b>	Per uso diagnostico in vitro		

**Versione: 3/2016 | Pubblicata: 2016-08**



**BAG Health Care GmbH**  
 Amtsgerichtsstraße 1-5 | Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0 | www.bag-healthcare.com  
 35423 Lich / Germany | Fax: +49 (0) 6404 / 925-250 | 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