

LAMBDA MONOKLONINIO HLA I IR II KLASĖS AUDINIŲ TIPAVIMO PLOKŠTELĖS

REF	Katalogo Nr. LM144, LM144A, LM144B, , LM172, LM272, LM372, LM72OR, LM96, , LMB2703, , MDR172, MDR272
IVD	Diagnostikai in vitro.

PASKIRTIS



Skirtos naudoti nustatant HLA I ir II klasės ląstelės paviršiaus antigenus, taikant nuo komplemento priklausomą mikrolimfocitotoksinį metodą.

SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

HLA I ir II klasės Lambda monokloninio tipavimo (LMT™) plokštelėse yra žinomo monokloninio reagento ir trušio komplemento mišinio, kuris yra naudojamas nustatyti HLA I ir II klasės antikūnų buvimą ant T ir B limfocitų. Kiekviename šulinėlyje yra 1 mikrolitras (1 µl) specifinio monokloninio ir komplemento mišinio, o taip pat 5 mikrolitrai (5 µl) beveik nelakaus mineralinio aliejaus. Kiekvienos plokštės sudėtyje yra teigiama ir neigiama kontrolė. II klasės tipavimo plokštelėse taip pat yra anti-B ir anti-T limfocitų monokloninių antikūnų.

PRINCIPAS(-AI)

Gyvybingi limfocitai yra inkubuojami su komplementu fiksuotų monokloninių antikūnų ir komplemento mišinyje. Jei limfocitai ekspresuoja antigeną, atpažįstamą pagal specifinį antikūną, Fab antikūno dalis fiksuojasi prie antigeno, sudarydama antigeno-antikūno kompleksą. Po to, kai susiformuoja šie kompleksai, komplemento C1q ir Ca⁺⁺ fiksuojasi prie FC antikūno dalies. Vienas IgM antikūnas turi fiksuoti vieną C1q molekulę arba du IgG antikūnai turi fiksuoti vieną C1q molekulę. C1q fiksavimas pradeda komplementų kaskadą, kuri sukelia ląstelių su antigenų-antikūnų kompleksais lizę. Kai reakcija neigiama, limfocitai išlieka gyvybingi. Kai reakcija teigiama, limfocitai yra žuvę.

REAGENTAI

A. Identifikacija

HLA I ir II klasės „Lambda“ monokloninio tipavimo plokštelėse yra anti-I ar II klasės monokloninių antikūnų ir trušio komplemento mišinio. Kiekviename šulinėlyje yra 1 µl specifinio monokloninio ir komplemento mišinio ir 5 µl beveik nelakaus mineralinio aliejaus.

Pastaba. Monokloniniai antikūnai gali būti gaunami iš pelės ar žmogaus organizmo.



B. Perspėjimas arba įspėjimas

- FDA paskirtis: IVD
- Įspėjimas.** Visi kraujo produktai turi būti laikomi potencialiai užkrečiamais. Atlikus FDA šiuo metu reikalaujamus atlikti testus pradinei medžiagai, iš kurios buvo gautas šis preparatas, testų rezultatai buvo neigiami. Nėra jokių žinomų testų metodų, visiškai užtikrinančių, kad produktai, paruošti naudojant žmogaus kraują, neperneš užkrečiamų agentų.
- Perspėjimas.** Etidžio bromidas yra žinomas karcinogenas. Naudokite taikydami atitinkamas saugos priemones. Gali būti žalingas, jei įsiskverbia į odą. Stenkitės, kad nepatektų į akis ar neužtikštų ant odos ar drabužių. Laikyti sandariai uždarytą. Po naudojimo kruopščiai nuplauti.
- Išsamią informaciją galite rasti medžiagos saugos duomenų lape.





C. Reagentų paruošimas naudoti

1. Žr. „Naudojimo nurodymai“.

D. Laikymo instrukcijos

Laikykite reagentus ant pakuotės nurodytoje temperatūroje. Sunaudoti iki atspausdinto galiojimo termino.

E. Gryninimas arba apdorojimas, reikalingi naudojimui

Žr. skyrių „Naudojimo nurodymai“.

F. Nestabilumo požymiai

Dėl bakterinio užteršimo ir (arba) anglies dioksido poveikio serumai pakeis pH. Šį pH pokytį rodo iš rausvos į geltoną pasikeitusi spalva. Jei įvyksta toks pasikeitimas, išmeskite plokšteles.

MĖGINIŲ ĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

- A. Kadangi gyvybingi limfocitai yra reikalingi serologiniam tipavimui, gautas kraujas turi būti apdorotas nedelsiant, iškart po gavimo. Limfocitų kiekis mažėja su laiku ir veikiant ekstremalioms temperatūroms. Kraujas turėtų būti paimamas, apdorojant rūgšties citrato dekstrozės tirpalu (ACD) arba natrio heparinu, laikomas horizontalioje padėtyje kambario temperatūroje (20–25 °C) ir analizuojamas 48 valandų laikotarpiu, siekiant panaudoti didžiausią T ir B limfocitų kiekį.

PROCEDŪRA

1. Pridedamos medžiagos

1. HLA I ir II klasės tipavimo plokštelė (-s), 72 ar 96 šulinėliai
2. Darbo lapai, kuriuose nurodytas kiekvieno monokloninio antikūno specifiškumas.

2. Reikalingos medžiagos, kurių nėra pakuotėje

1. Mikrošvirkštai
2. Insta-Seal™ (OLI Kat. Nr. TIS250U) dengiamieji objektiniai stikleliai ir stikliniai objektiniai ir petrolatas (Vaseline™)
3. Dažymo ir fiksavimo reagentai:
 - a. Dažų išskyrimui tirti: Eozinas Y (natrio pagrindu) ir formaldehidas
 - b. Fluorescencijai tirti: FluoroQuench™ AO/EB (OLI Kat. Nr. FQAE-100/500) FQZAE-100 arba fluorescencinį testavimą naudojant CFDA (žiūrėkite apačioje „B“ dalį) arba pridėkite 1 ml EB pradinio tirpalo į 9 ml hemoglobino ar 1 % dažų (žr. medžiagų Nr. 4–7 žemiau).
- a. Atšaldytas hemoglobinas
 - a. Iš liofilizuoto jaučio serumo:
 - (1) Ištirpinkite 10 gm hemoglobino 100 ml 5 % EDTA PBS. Įpilkite 1 ml 1 % natrio azido.
 - (2) Centrifuguokite 45 minutes 1000 g. Laikykite supernatantą –20 °C temperatūroje.
 - b. Iš stabilizuotų raudonųjų kraujo kūnelių:
 - (1) Pradinis tirpalas: supakuotus eritrocitus praplaukite 3 kartus fiziologiniu tirpalu. Paruoškite 70% hematokrito ir sušaldykite ir atšildykite. Centrifuguokite 45 minutes, esant 20000 g. Dializuokite 3 dienas, naudodami fiziologinį tirpalą.
 - (2) Darbinis tirpalas: įpilkite 10ml 5 % EDTA PBS. Įpilkite 1 ml 1% natrio azido į 89ml hemoglobino. Laikykite –20 °C temperatūroje.
- b. 1% dažų darbinis grū dintas skystis

- a. Ištirpdykite 1 g jaučio serumo albumino (BSA) 10 ml 5% EDTA PBS.
- b. Į 9,8 ml BSA/5% EDTA/PBS įpilkite:
 - (1) 100 µl 1% natrio azido.
 - (2) 100 µl „Higgins“ juodo kaligrafijos rašalo
6. 5% EDTA (dinatrio) PBS
 - a. Ištirpdykite 5 g EDTA 90 ml PBS.
 - b. pH pakoreguokite iki 7,2 su M NaOH.
 - c. Paruoškite galutinį turinį iki 100 ml su PBS.
7. Etidžio bromido (EB) pradinis tirpalas: ištirpinkite 50 mg 1 ml distiliuoto vandens. Pridėkite 49 ml PBS. Pakaitinkite vandens vonelėje esant 56° C temperatūroje 30 minučių. Laikykite -20° C temperatūroje.
8. Karboksifluoresceino diacetatas (CFDA)
 - a. Pradinis tirpalas: ištirpinkite 10 mg CFDA 1 ml acetono stikliniame mėgintuvėlyje. Laikykite -20° C temperatūroje Bekmano mėgintuvėliuose.
 - b. Darbinis tirpalas: naudokite vieną iš šių:
 - (1) Paruoštą PBS esant pH 7,2: pridėkite 30 µl CFDA pradinio tirpalo į 5 ml PBS (pH 7,2). Laikykite 2 - 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.
 - (2) Paruoštą PBS esant pH 5,5: pridėkite 30 µl CFDA pradinio tirpalo į 5 ml PBS (pH 5,5). Laikykite 2 - 5° C temperatūroje ne ilgiau nei 1 savaitę.

C. Naudojimo nurodymai

Pastaba: Informacijos apie limfocitų izoliacijos metodus, ieškokite „ASHI Laboratory Procedure Manual“ (ASHI Laboratorinių tyrimų metodikos vadove)⁵ arba produkto informaciniame lapelyje apie „One Lambda“ „FluoroBeads™“ ar „LymphoKwik™“ dėl limfocitų atskyrimo metodų.

1. Testavimas

- a. Atšildykite padėklus kambario temperatūroje (20– 25 °C) 15 minučių ir naudokite per 1 valandą po atšildymo. Dėmesio! Neužšaldykite dar kartą.
- b. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 1 µl 2 X 10⁶ ląstelių/ml T limfocitų suspensijos į I klasės plokštelę, arba B limfocitus į II klasės plokštelę. Apie fluorescencinį testavimą naudojant CFDA, žiūrėkite apačioje „2“ dalį.
- c. Sumaišykite mikrolašelius kartu, naudodami elektrostatinį maišiklį arba laidą.
- d. Inkubuokite plokšteles kambario temperatūroje (20–25 °C) 1 valandą.
- e. Po inkubavimo nudažykite ir užfiksuokite ląsteles.
 - (1) Dažų atskyrimo testui į kiekvieną šulinėlį įpilkite:
 - 5 µl eozino dažų, po 2 minučių 5 µl formaldehido į kiekvieną šulinėlį
 - (2) Fluorescenciniam testavimui įpilkite 5 µl FluoroQuench™ AO/EB (OLI Kat. Nr. 100/500), FQZAE-100. CFDA testavimui („2“ dalis žemiau), įpilkite 5 µl hemoglobino į kiekvieną šulinėlį arba įpilkite 50 µl etidžio bromido.
- f. Uždenkite plokšteles Terasaki Insta-Seal™ (OLI Kat. Nr. TIS250U). Jeigu vietoj to naudojama stiklo skaidrė, izoliuokite, naudodami ištirpintu petrolatu. Palaikykite plokšteles (20 - 25° C) 15 minučių, kad leistumėte limfocitams nusistovėti. Dažų atskyrimo plokštelės gali būti laikomos 2 - 5° C temperatūroje iki 2 savaičių. Fluorescentinės plokštelės gali būti laikomos 2 - 5° C temperatūroje tamsoje iki 2 dienų. Plokštelės, uždengtos Terasaki Insta-Seal™ dengiamaisiais stikleliais, turi būti nuskaitomos tą pačią dieną, kai jos paruošiamos testuoti.

2. Fluorescencija: limfocitų paruošimo CFDA žymėjimas

- Inkubuokite limfocitus 500 µl CFDA pH 7,2 esant 37 °C temperatūrai 15 minučių arba CFDA pH 5,5 5 minutes esant 20–25 °C temperatūrai. Limfocitams, izoliuotiems magnetinėmis granulėmis, inkubuokite 500 µl CFDA pH 5,5 esant 20–25 °C temperatūrai 10 minučių.
- Centrifuguokite 1 minutę 1000 g. Pašalinkite supernatantą. Limfocitus, izoliuotus magnetinėmis granulėmis, uždėkite ant magneto 1 minutę. Pašalinkite supernatantą.
- Resuspenduokite į PBS.
- Pakartokite dukart b ir b žingsnius.
- Resuspenduokite ląsteles Mak-Kojaus (McCoy's) mėgintuvėliuose su 0,5% FCS, ir pritaikykite ląsteles 2 x 10⁶ ląstelių/ml koncentracijai. Saugokite nuo šviesos.
- Vadovaukitės aukščiau pateikto „Testavimo“ skyriaus b–f žingsniais.

REZULTATAI

A. Duomenų gavimas

- Ląstelės gali žūti bet kuriame teste, kur HLA ląstelės paviršiaus antigenas yra atpažįstamas pagal jam prilygstantį anti-HLA antikūną. Kai naudojamas dažų pašalinimas, neigiami (gyvybingi) limfocitai atrodo maži, šviesūs ir lūžtantys (refraktilūs). Teigiami (negyvi) limfocitai atrodo tamsūs ir nerefraktiški su eozino dažais. Reakcijų rezultatai įvertinami pagal žuvusių ląstelių procentą.

B. Duomenų analizė

- Fluorescenciniam testavimui naudojant karboksifluoresceino diacetatą (CFDA) ar akridino oranžą (AO), neigiami (gyvybingi) limfocitai atrodo žali. Naudojant etidžio bromidą (EB) ar propidiumo jodidą (PI), teigiami (negyvi) limfocitai atrodo raudoni.

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

- Sunkumai izoliuojant ląsteles ir limfocitų užteršimas eritrocitais, juos ruošiant, mielės, monocitai, trombocitai ar granulocitai gali būti klaidingų rezultatų priežastis. Be to, klaidingi rezultatai gali būti gauti, kai ląstelių koncentracijos yra virš ar žemiau leistinų ribų. Bakterinis užteršimas ar monokloninių reagentų pH pokytis gali lemti klaidingas neigiamas reakcijas. Tam tikri HLA antigenai dažnai rodo silpnus specifiškumus. Jie yra vadinami kryžmiškai reaguojančiais antigenais ir yra detalizuojami antigenais ir antikūnais iš kiekvienos plokštelės pagal pridėtamą reakcijų modelių informacinį lapą.
- II klasės tipavimo plokštelėse anti-B limfocitų kontrolė turi būti teigiama, kad būtų patvirtinta, kad paruoštos ląstelės yra prisodrintos B limfocitų. Jei ši kontrolė yra žemesnė nei reakcijos rezultatas **6**, testas nėra galiojantis.

NUMATOMOS REIKŠMĖS

Mikroskopinis testų įvertinimas

Reakcijų rezultatai įvertinami pagal žuvusių ląstelių procentą. Jei neigiamoje kontrolėje yra žuvusių limfocitų, negyvų ląstelių likusiuose šulinėliuose procentas turi būti atitinkamai pakoreguotas.

ASHI rodmenų standartai yra parodyti šioje lentelėje:

<u>Rezultatas</u>	<u>Žuvusių ląstelių</u>	<u>Interpretavimas</u>
1	0-10%	Neigiamas
2	11-20%	Abejotinas neigiamas
4	21-50%	Silpnas teigiamas
6	51-80%	Teigiamas
8	81-100%	Stiprus teigiamas
0	Nenuskaitoma	

Fenotipų dažnumai HLA I ir II klasei skirsis palyginus skirtingas populiacijas (t.y. baltųjų rasės Amerikos juodaodžių, Rytų Azijos, ir t. t.).⁴

SPECIALIOSIOS VEIKIMO SAVYBĖS

A. Pajėgumas ir specifiškumas

Testo reagentai buvo tiksliai charakterizuoti pagal atskirus nuoseklius serologinius skringus. Standartinės sušaldytų limfocitų mėginių panelės yra naudojami dviejose atskirose patikrose.

Du trečdaliai visų atrinktų reagentų yra stiprūs su aiškiai išreikštu specifiniu HLA reaktyvumu (su 70% stiprumo indeksu), leidžiant ne daugiau nei 10% klaidingų teigiamų ir 15% klaidingų neigiamų reakcijų. Likęs vienas trečdalis reagentų neatitinka šių kriterijų, bet yra naudingi tyrimo atžvilgiu, naudojant pagrįsti kitus aiškiai išreikštus antikūnus. Multispecifiniai antikūnai yra naudojami tik kai nėra monospecifinių antikūnų tam tikram specifiškumui nustatyti. Multispecifiniai antikūnai yra išrenkami tomis pačiomis savybėmis visiems specifiškumams kaip ir monospecifiniai antikūnai. Patikra palyginus su šviežiai paruoštų limfocitų paneliu, yra naudojama patvirtinti ir įteisinti serumo stiprimą ir specifiškumą. Analizė yra atliekama naudojant aštuntojo tarptautinio audinių suderinamumo seminario 1980 m. (Eighth International Histocompatibility Workshop) kompiuterinius metodus.⁴

B. Neigiama kontrolė

Neigiamos kontrolės antiserumas yra gautas iš sveiko vyro organizmo, turinčio AB kraujo grupę, kuris neturi citotoksinio reaktyvumo testuose su laisvai parinktais limfocitų donorais. Ši kontrolė yra atliekama nustatyti limfocitų gyvybiškumą.

C. Teigiama kontrolė

Teigiama kontrolė yra monokloninis antikūnas ir yra stipriai citotoksiškas žmogaus limfocitams. Ši kontrolė yra atliekama nustatyti komplementų gyvybiškumą.

D. Anti-B limfocitų kontrolė

Anti-B limfocitų kontrolė yra monokloninis antikūnas ir yra stipriai citotoksiškas B limfocitams ir nereaguojantis prieš trombocitus, monocitus ir eritrocitus. Ši kontrolė yra naudojama nustatyti B limfocitų grynumą.

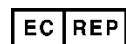
BIBLIOGRAFIJA

1. Terasaki PI, Bernoco F, Park MS, Ozturk G, and Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA A, B, C and D antigens. Am J. Clin Pathol 69: 103-120, 1978.
2. Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G. B lymphocyte isolation by thrombin nylon wool. In Histocompatibility Testing. Terasaki PI, Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, CA 287-288, 1980.
3. ASHI Laboratory Manual, 2nd ed. Edited by Zachary, Andrea A. and Teresi, Gary, p. 199, 1990.
4. Terasaki PI, Ed., Histocompatibility Testing. Los Angeles, CA, 1980.
5. Nikaein A, Ed., ASHI Procedure Manual, 3rd Edition, ASHI, Lenexa, KS.

PREKĖS ŽENKLAI





™ „FluoroBeads“, „FluoroQuench“, „Insta-Seal“, „Lambda Monoclonal Trays (LMT)“ ir „LymphoKwik“ yra „One Lambda, Inc.“ prekės ženklai.

GLIOTASIS ATSTOVAS EUROPOJE



MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175, Hanoveris, Vokietija

SIMBOLIŲ PAAIŠKINIMAS (nuoroda EN ISO 15223-1: medicinos prietaisai – simboliai, naudotini medicinos prietaisų etiketėse, žymėjimuose ir pateikiamoje informacijoje)

Simbolis	Reikšmė
 ISO 7000 Reg Nr. 1641	Žr. naudojimo instrukcijas
 ISO 7000 Reg Nr. 2493	Katalogo numeris
	In vitro diagnostinis medicininis prietaisas
 ISO 7000 Reg Nr. 0434A	Dėmesio! Žr. pridėtus dokumentus
 ISO 7000 Reg Nr. 0659	Biologinis pavojus
 ISO 7000 Reg Nr. 0633	Viršutinė temperatūros riba
	Partijos kodas
 ISO 7000 Reg Nr. 3082	Gamintojas
	Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje
 ISO 7000 Reg Nr. 2497	Pagaminimo data
 ISO 7000 Reg Nr. 2607	Sunaudoti iki nurodytos datos

Partijos laukas ant etiketės skirtas pagaminimo atvejui sekti.

PADARYTI PATAISYMAI

Pataisymas	Išleidimo data	Pataisymo paaiškinimas
01	2019-04-08	Atnaujinta vidinė dokumentų valdymo sistema. Dokumentų turinys nepakeistas.
02	2019-09-20	Atnaujinta kontaktinė informacija ir adresas pasikeitus oficialiai gamybos vietai.
03	Dabartinė	Pašalinta Stain-Fix™ (OLI kat. Nr. SF-500), FluoroQuench EB™ (OLI kat. Nr. FQEB-500). Pašalinta katalogo Nr. 2LM72, LMB2701, LMBL72, MDR160. Naudojimo nurodymų eilutėje C.1.b. pašalinta „arba“ „B“.

