

## Gebrauchsanleitung

B-SCREEN® ist ein qualitativer Festphasenenzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von IgG Antikörper gegen HLA Klasse II Antigene.

Zum in-vitro Gebrauch.

## Zusammenfassung und Erläuterungen

HLA ist ein "major antigenic" System zur Bestimmung/ Bewertung der Überlebenschancen nach Transplantationen oder nach Thrombozytentransfusionen bei sensibilisierten Individuen.<sup>1</sup>

HLA Antikörper werden durch aktive Immunisierung während einer Schwangerschaft, durch Transfusion von Blutprodukten oder durch vorausgegangene Organtransplantationen erworben. Eine Alloimmunisation führt in ca. 33% aller exponierten Fälle zur Antikörperbildung.<sup>2</sup>

Die Festphase des B-SCREEN® Enzymimmunoassays wird beschichtet mit gereinigten HLA Klasse II Glykoproteinen, isoliert von EBV transformierten B-Lymphozyten Zelllinien. Die Lymphozyten werden so ausgewählt, daß ein möglichst breites Spektrum an HLA Klasse II Antigenen vorliegt.

## Testprinzip

Patientenserum wird in die Vertiefungen, die mit gereinigten HLA Klasse II Glykoproteinen beschichtet sind, pipettiert. Spezifische Antikörper in der Patientenprobe binden an diese Festphasenantigene. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Human IgG zugefügt. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe des chromogenen Substrats PNPP entsteht eine Farbreaktion, die nach 30 Minuten mit einer 3 M NaOH-Lösung abgestoppt und photometrisch ausgewertet wird.

## Reagenzien

Maximale Anzahl an Bestimmungen pro Testpackung: 44

Lagern Sie die Reagenzien wie auf dem Label angegeben.

- |            |   |
|------------|---|
| <b>MS</b>  | 1. Mikrowells: die Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit gereinigten spezifischen HLA Klasse II Glycoproteinen. Die Teststreifen sind in einem wieder verschließbaren Beutel eingeschweißt. Gebrauchsfertig.   |
| <b>TCW</b> | 2. Waschlösungskonzentrat (10 x konzentriert): TRIS –Aminomethan gepufferte Lösung mit Na- Cl <sub>2</sub> und TWEEN 20; enthält 1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnen. Diese Waschlösung kann bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 7 Tagen bei 2-8°C gelagert werden. |
| <b>SD</b>  | 3. Probenverdünnungspuffer: Phosphat gepufferte saline Lösung mit Rinderalbumin und Mausserum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig.  |
| <b>SB</b>  | 4. Substratpuffer: enthält Diethanolamin, MgCl <sub>2</sub> und 0,02% Natrium- Azid. Gebrauchsfertig. Dunkel aufbewahren.   |
| <b>SS</b>  | 5. Stopplösung: 3 M NaOH. Gebrauchsfertig. Mit Vorsicht verwenden!  |
| <b>AG</b>  | 6. Konjugat: ein mit alkalischer Phosphatase markierter gereinigter Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen humanes IgG; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.   |
| <b>PN</b>  | 7. PNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat, kristallin. In destilliertem Wasser auflösen und vor Gebrauch mit Substratpuffer verdünnen. Dunkel aufbewahren.   |
| <b>PC</b>  | 8. Positives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.   |

**NC** 9. Negatives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.

**PS** 10. Abklebefolien.

### **Vorsichtsmaßnahmen**

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Vermeiden Sie jede Kontaminationen des Verdünnungspuffers und des Konjugats. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Serum führt zur Neutralisation des Konjugats und damit zum Testausfall.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die verdünnten Konjugate, Kontrollen und Substrate.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Die enzymatische Substratreaktion im letzten Inkubationsschritt ist Temperatur abhängig und sollte bei 22-25°C durchgeführt werden.
- Durch Abweichungen bei den verwendeten Materialien und Geräten und durch Temperaturunterschiede in den Laboratorien kann es sinnvoll sein, die abschließende Inkubationszeit leicht zu erhöhen bzw. zu verringern, um die korrekten Werte für die Kontrollen zu erreichen. Kontrollieren Sie diese Anpassung regelmäßig.

### **Warnhinweis**

- Alle Kontrollen humanen Ursprungs werden auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HB<sub>s</sub>-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Einigen Reagenzien ist Natrium-Azid als Konservierungsmittel zugesetzt. Bei Kontakt bitte mit reichlich Wasser spülen. Natrium-Azid ist ein Gift und wirkt im Körper toxisch.
- Die Stopplösung (NaOH) wirkt korrosiv. Vermeiden Sie deshalb jeden Kontakt mit der Haut und den Augen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

### **Probengewinnung**

Entnehmen Sie das Blut ohne Zusatz von Antikoagulantien unter den üblichen aseptischen Bedingungen und verwenden Sie es möglichst frisch, um falsch positive oder negative Ergebnisse durch zu lange Lagerung oder Kontamination der Probe auszuschließen. Die Proben können bei 2-8°C bis zu 48 Std. aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung (> 48 Stunden) sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. So können diese Proben bis zu 3 Jahren aufgehoben werden. Lagern Sie die Proben nicht in "No-Frost Gefrierschränken"!

Trennen Sie das Serum für die Lagerung oder den Versand von den übrigen Blutbestandteilen.

Partikel oder Ausflockungen in der Probe können zu falsch positiven Ergebnissen oder zu schlechten Doppelbestimmungen führen. Zentrifugieren Sie diese Proben vor ihrer Austestung.

Verwenden Sie ausschließlich humanes Serum für diesen Test. Die Proben dürfen nicht vorverdünnt sein. Dieses führt zu falsch negativen Ergebnissen.

Keine bakteriell verunreinigten, hämolytischen, lipämischen, ikterischen oder Hitze inaktivierten Proben verwenden, um widersprüchliche Ergebnisse zu vermeiden.

### **Durchführung**

#### **Mitgelieferte Materialien:**

Die Vials enthalten z.T. mehr Reagenz, als auf dem Label angegeben. Entnehmen Sie deshalb immer die benötigten Mengen für die Verdünnungen mit kalibrierten Pipetten.

1. 12 – 1 x 8 Teststreifen in einem Halterahmen

2. 1 x 50 ml Waschlösungskonzentrat
3. 1 x 14 ml Probenverdünnungspuffer
4. 1 x 14 ml Substratpuffer
5. 1 x 14 ml Stopplösung
6. 1 x 80 µl Anti-Human IgG Konjugat
7. 6 x 50 mg PNPP Substrat
8. 1 x 0.45 ml positives Kontrollserum
9. 1 x 0.7 ml negatives Kontrollserum
10. 12 Abklebefolien

**Zusätzlich benötigte Materialien:**

1. Röhrchen für die Verdünnungen der Proben, Kontrollen und Reagenzien.
2. Transferpipetten
3. Variable Pipetten: 10-100 µl, 100-1000 µl und Einwegspitzen
4. Laborwecker
5. ELISA- Reader mit einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm
6. Destilliertes Wasser
7. Papiertücher
8. ELISA-Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. Wasserbad bei 37°C oder Brutschrank

**Testdurchführung**

1. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur.
2. Stellen Sie die benötigte Waschlösung her, indem Sie das Waschlösungskonzentrat 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen und gut mischen.
3. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Proben fest. Weisen Sie mit Hilfe des Protokollbogens/ Recording Sheet jeder Probe ihre Positionen (2 Vertiefungen je Probe) zu.  
(Benutzen Sie für einen Einzelansatz die Rückseite des Protokollbogens.)

Vorbereitung der Proben und Kontrollen

4. Verdünnen Sie wie angegeben und mischen Sie gut durch:

	Volumen Probenverdünnungspuffer	Volumen Probe
PC	75 µl	75 µl
NC Einzelansatz	75 µl	75 µl
mehrere Patientenproben	110 µl	110 µl
Patientenprobe	100 µl	100 µl

5. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen aus der Verpackung und verschließen Sie den Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort nach Entnahme.

Hinweis: Jede Testpackung enthält nur ein Halterahmen. Heben Sie den Rahmen für weitere Tests auf.

Hinweis: Positionieren Sie den Rahmen so, dass die Vertiefung A1 oben links ist. Kontrollieren Sie den richtigen Sitz und das Einrasten der Streifen im Rahmen. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen. Behalten Sie diese Positionierung während der Testdurchführung bei.

6. Geben Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung und lassen Sie alles bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten stehen.
7. Verwerfen Sie den Inhalt und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
8. Pipettieren Sie 50 µl der verdünnten Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen (siehe Protokollbogen).

Hinweis: Die Blank-Vertiefungen bleiben leer.

Hinweis: Werden pro Testansatz mehrere Patientenproben untersucht, sind die Kontrollen nur einmal erforderlich. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen.

9. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

10. Verdünnen Sie das Konjugat 1:100 mit dem Probenverdünnungspuffer in einem Polypropylen Röhrchen, um Aktivitätsverluste des Konjugates auszuschließen.

Teststreifen:	2 – 1 x 8	12 – 1 x 8
AG	10 µl	60 µl
SD	1.0 ml	6.0 ml

Hinweis: Das Konjugat ist sehr viskos. Ziehen Sie es deshalb vorsichtig auf und mischen Sie es im Probenverdünnungspuffer gut durch.

11. Waschschritte:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, daß nach dem letzten Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

12. Geben Sie 50 µl des verdünnten Konjugats in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Blanks.

13. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

14. Lösen Sie das kristalline PNPP-Substrat in 500 µl destilliertem Wasser auf und mischen Sie gut durch, indem Sie den Verschuß wieder einsetzen und das Vial gut schütteln. Bitte bis zur weiteren Verwendung vor Licht schützen.

15. Verdünnen Sie das PNPP 1:100 mit dem Substratpuffer.

Teststreifen:	2 – 1 x 8	12 – 1 x 8
PN	20 µl	120 µl
SB	2.0 ml	12.0 ml

Gut mischen! Vor Licht schützen.

16. Waschschritte:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Arbeiten Sie die nächsten 3 Schritte genau ab.

17. Geben Sie 100 µl der verdünnten PNPP-Lösung in jede Vertiefung mit Ausnahme der Blanks.

18. Die Reaktionsansätze im Dunkeln exakt 30 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.

Hinweis: Die Inkubationszeit bzw. -temperatur nach Zugabe des PNPP ist kritisch. Halten Sie sie genau ein und starten Sie die Zeit mit der Zugabe des PNPP in die erste Vertiefung.

19. 100 µl Stopplösung in gleicher Abfolge wie das Substrat in alle Vertiefungen geben. Füllen Sie die Blanks mit zusätzlichen 100 µl Stopplösung auf.
20. Die Reaktionen werden nach dem Stoppen im ELISA-Reader bei 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm ausgewertet. Lassen Sie die Streifen im Dunkeln bis zu max. 30 Minuten stehen, wenn die Auswertung nicht sofort nach dem Abstoppen gemacht werden kann.
21. Ziehen Sie die Blank-OD Werte von den Proben und Kontrollen ab. Bei vielen ELISA-Readern läßt sich dieses programmieren
22. Übertragen Sie Ihre Werte auf den Protokollbogen/Recording Sheet.

### **Qualitätskontrolle**

Die Qualitätskontrolle des B-SCREEN® besteht aus dem Einsatz positiver und negativer Kontrollen, die bei jedem Ansatz mitgeführt werden, um die korrekte Durchführung und die Reaktivität der Reagenzien zu bestätigen.

Kriterien für einen validen Test:

	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle
OD Mittelwert	0.070 – 0.250	≥ 1.500

Die Doppelbestimmungen sollten nicht mehr als 20% abweichen. Alle Proben bzw. Kontrollen außerhalb dieses Bereiches sollten wiederholt werden.

Hinweis: Die Gründe für schlechte Doppelbestimmungen können vielfältig sein: Fehler beim Pipettieren der Proben und Reagenzien, Fehler bei den Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, falsche Volumina oder Verschleppungen. Diese führt zu falschen Ergebnissen.

### **Interpretation der Ergebnisse**

Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion (OD-Werte) der Probe gleich oder größer ist als das Doppelte des Mittelwerts der negativen Kontrolle.

### **Einschränkungen**

Kontaminationen der Reagenzien, falsche Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, unzureichendes Waschen und Ausklopfen der Vertiefungen, falsche Volumina, Streulicht bei der Substratinkubation, oder Auslassung von Schritten bei der Abarbeitung führen zu falschen Ergebnissen.

Das Vorhandensein von Immunkomplexen oder anderen Immunglobulin Aggregaten in der Patientenprobe kann zu unspezifischen Bindungen und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Alle Ergebnisse sollten immer mit weiteren serologischen Tests und dem klinischen Bild abgesichert werden.

Schwache Titer oder Antikörper geringer Avidität oder seltener Ausprägung werden u.U. nicht erfaßt und können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Nicht HLA-Lymphozytotoxische Antikörper werden im Test nicht erfaßt.

IgM, IgA oder HLA Klasse I Antikörper werden in diesem Test nicht erfaßt.

Die gereinigten HLA Klasse II Glykoproteine, die bei der Herstellung dieses Produktes verwendet werden, stammen von EBV transformierten B-Lymphozyten Zelllinien mit folgenden HLA Klasse II Antigenen: DR1, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DR103, DR51, Dr52 und DR53.

Monospezifische Antikörper gegen seltene Allelen, die nicht im Pool vertreten sind, werden u. U. nicht erfaßt.

Einige nicht zytotoxische HLA-Antikörper, die im LCT nicht reaktiv sind, werden im ELISA erfaßt.

## Spezifische Charakteristika der Durchführung

Bei korrekter Lagerung und Anwendung wie oben beschrieben dient dieser Test dem Nachweis von IgG Antikörpern gegen HLA Klasse II Antigene.

Um die Reaktivität und Spezifität zu garantieren, wird jede Charge des B-SCREEN® mit bekannten Seren, die Alloantikörper enthalten und mit den auf der festen Phase beschichteten HLA Klasse II Antigenen reagieren, getestet wie auch mit Proben, die diese Antikörper nicht enthalten.

## Evaluation

		Vergleichende Methode		Gesamt
		Positiv	Negativ	
B-SCREEN®	Positiv	70	3	73
	Negativ	2	132	134
	Gesamt	72	135	207

Übereinstimmung: 97.6%

Co-Positivität: 97.2%                      Co-Negativität: 97.8%

Vergleichende Methode: Durchflußzytometrie

## Referenzliteratur

1. Marsh SGE, Parham P, Barber LD, The HLA Facts Book. Academic Press 2000: 84-91.
2. Rodey Glenn E. HLA Beyond Tears. De Novo, Inc. 2000;213.



**GTi® DIAGNOSTICS**

Good science starts with people.™

20925 Crossroads Circle, Suite 200  
Waukesha, WI 53186-4054 USA  
(262) 754-1000 oder 1-800-233-1843

REF BCSG

Rev. 2007-06-27 (G)

EC REP Qarad b.v.b.a.  
Volmolenheide 13  
B-2400 Mol  
Belgium



[www.gtidiagnostics.com](http://www.gtidiagnostics.com)