

Lymphotype HLA

For the detection of human HLA antigens

Package size

REF ⁽⁴⁾	823 020	HLA-ABC 72
REF ⁽⁴⁾	823 023	HLA-AB 72 AN
REF ⁽⁴⁾	823 028	HLA-AB 72 oriental
REF ⁽⁴⁾	823 030	HLA-ABC 120
REF ⁽⁴⁾	823 031	HLA-AB 120 special
REF ⁽⁴⁾	823 045	HLA-ABC 144 Italia
REF ⁽⁴⁾	823 070	HLA-AB 144
REF ⁽⁴⁾	823 100	HLA-DR/DQ 60
REF ⁽⁴⁾	823 102	HLA-DR/DQ 72
REF ⁽⁴⁾	823 110	HLA-B27 special
REF ⁽⁴⁾	823 111	HLA-B27 common
REF ⁽⁴⁾	823 115	HLA-B5

MP	Microplate
COMP	Complement
IVD	For In Vitro Diagnostic Use

Intended Use

Biotest Lymphotype HLA is used for the detection of human HLA antigens in a complement-dependent microlymphocytotoxicity test (1,2,3,4,6,9). Biotest Lymphotype HLA consists of ready-to-use microplates containing pre-loaded anti-HLA reagents. The anti-HLA reagents can be monoclonal HLA antibodies or human polyclonal HLA antisera (5). Lymphotype HLA-B27 is used to detect HLA-B27 antigen. Since there is found to be a strong association worldwide between HLA-B27 and ankylosing spondylitis, it is one of the tools used to diagnose this disease (7). Lymphotype HLA-B5 is used to detect HLA-B5 antigens. The order and specificity of the pre-loaded anti-HLA reagents can be obtained from the worksheet enclosed with every kit. Antibodies with identical specificity but different ID numbers are from different donors and serve the purpose of providing greater confidence in the results.

Summary and Explanation

HLA antigens are glycoproteins present on the cell membrane. They are divided into two classes. Class I antigens (HLA-ABC) can be found on almost all nucleated cells. Class II antigens (HLA-DR/DQ) are to be found on the surface of only a few cell populations. All circulating lymphocytes in the peripheral blood contain HLA-ABC antigens. B-lymphocytes possess DR/DQ antigens in addition. For HLA-ABC typing, either a whole lymphocyte population can be used or a T-lymphocyte population. For DR/DQ typing, a sample rich in B-lymphocytes must be produced, as these account for only about 10 - 15 % of the whole lymphocyte population.

Principle of the Microlymphocytotoxicity Test

For the determination of HLA antigens, HLA antibodies with known specificity must be incubated with a lymphocyte suspension of the samples in the presence of complement.

After the addition of lymphocytes to Lymphotype HLA, the lymphocytes will be lysed in the presence of the corresponding antibody and complement. This is made visible using a stain (e.g. eosin). The assessment of lysed and non-lysed lymphocytes is carried out using an inverse phase contrast microscope.

Reagent Description

Biotest Lymphotype HLA contains human, polyclonal HLA antisera or monoclonal HLA antibodies of stated specificity for the determination of HLA class I or HLA class II antigens. The monoclonal antibodies can be of murine or human origin. Each well contains 1 µl of anti-HLA reagent and 6 - 8 µl of covering oil to prevent evaporation. Every Lymphotype HLA-ABC contains a negative and a positive control. Every Lymphotype HLA-DR/DQ contains in addition an anti-B-lymphocyte and an anti-T-lymphocyte control. The arrangement of the individual anti-HLA reagents can be found in the accompanying worksheet. For macroscopic checking purposes and for controlling of pH value the anti-HLA reagents are coloured with phenol red. 0.095% sodium azide is added to each anti-HLA reagent as a preservative.

Statement of Precautions

The test must be performed by well-trained and authorised laboratory technicians.

All materials of human origin used in this product have been tested and found to be non-reactive for HBsAg, anti-HCV and anti-HIV-1/2. However, all products of human origin should be considered to be potential transmitters of hepatitis, HIV or other infectious agents. Appropriate safety measures are recommended.

All used microplates **MP** should be treated as potentially infectious and should be destroyed according to the valid national guidelines.

Storage

The microplates **MP** and the lyophilised complement **COMP** supplied are stable up to the date stated on their individual labels.

Lymphotype HLA must be stored at -20 °C or below and used before the expiration date. The package supplied in dry ice must be transferred **immediately** after receipt to storage at -20 °C or below. Opened Lymphotype HLA packages must not be stored together with dry ice.

Thawed microplates **MP** should be used for testing within 60 minutes. **Do not refreeze already thawed plates!**

Indications of deteriorations

A yellow colouration of the anti-HLA reagents which still remains after thawing may indicate a change of the pH value. Those microplates **MP** should **not** be used for the test.

Specimen Collection and Preparation

Isolation of the lymphocytes (density gradient centrifugation)

- Mix approx. 5 ml (10 - 20 ml for HLA-DR/DQ typing) of a fresh, heparinised blood sample (approx. 10 units of heparin per ml of blood) with the same volume of Hanks Solution.
It is possible to store the blood sample at room temperature (20...24 °C) for up to 24 hours.
- Place a quantity of Lymphoflot (20...24°C) into a centrifuge tube and cover it with an equal quantity of diluted blood such that blood and Lymphoflot do not mix.
- Centrifuge for 20 minutes at 1000 x g without braking. The lymphocytes will settle as a white ring at the boundary between the plasma and the Lymphoflot. Using a pipette, carefully transfer the ring to a fresh centrifuge tube, fill the tube with Hanks Solution and mix.
- Centrifuge for 10 minutes at 230 x g, pour off the supernatant, resuspend the sediment, fill the tube with Hanks Solution and mix.
- Centrifuge again for 10 minutes at 110 x g. Pour off the supernatant.
- For HLA-ABC typing, resuspend the lymphocyte sediment in Lymphostabil. The lymphocyte suspension should contain approximately 2000 - 3000 lymphocytes/µl.

Note: The lymphocytes can also be isolated using immunomagnetic beads. A description of the lymphocyte separation method and the differing incubation times can be found in the Beads package insert.

For performing the HLA-ABC typing test, continue at Section "Microlymphocytotoxicity test". For performing the HLA-DR/DQ typing test, continue at Section "Separation in T- and B-lymphocytes".

Separation in T- and B-lymphocytes

- Loosely fill a 2 ml disposable syringe or similar with approx. 0.15 g of nylon wool (= wool column). Wash out the column using approx. 20 ml of Hanks Solution and approx. 10 ml of medium (medium = 10 % (V/V) FCS in Lymphostabil), in both cases warmed to 37°C.
- Seal the wool column at both ends using Parafilm and incubate for 30 min. at 37 °C in an incubator or water bath. Prepared in this way, wool columns can be stored at -20°C or less until they are needed. After thawing and washing with medium at 37°C, the wool columns are ready for use again.
- Resuspend the lymphocyte sediment from step 5 of specimen preparation in 1 ml of medium warmed to 37°C and place onto the top of the wool column. Seal the wool column with Parafilm and incubate for 30 minutes at 37 °C.
- Place a cannula on the wool column to reduce the flow rate.
- Wash out the T-lymphocytes, which do not adhere, using 10 - 20 ml of Hanks Solution warmed to 37°C and collect them in a suitably labelled centrifuge tube.
- After removing the cannula, wash out the B-lymphocytes into a second centrifuge tube using approx. 2 ml of medium warmed to 37°C. Using tweezers, carefully squeeze out the nylon wool and loosen it again. Repeat this procedure 4 - 5 times.
- Centrifuge the T- and B-lymphocytes for 10 minutes at 230 x g. Pour off the supernatant.
- Resuspend the T- and B-lymphocytes using Lymphostabil and adjust to a concentration of 2000 - 3000 lymphocytes/µl.

Use the tube containing the T-lymphocytes for HLA-ABC typing and the tube containing the B-lymphocytes for HLA-DR/DQ typing.

Procedure

Materials Provided

- Each Lymphotype HLA consists of 6 microplates **MP** and two bottles of complement **COMP**.
 - Lymphotype HLA-ABC 72 (6 microplates **MP** with 72 anti-HLA reagents for 6 HLA-ABC typing tests)
 - Lymphotype HLA-AB 72 (6 microplates **MP** with 72 anti-HLA reagents for 6 HLA-AB typing tests)
 - Lymphotype HLA-ABC 120 or 144 (3 x 2 microplates **MP** with 120 or 144 anti-HLA reagents for 3 HLA-ABC typing tests)
 - Lymphotype HLA-AB 120 or 144 (3 x 2 microplates **MP** with 120 or 144 anti-HLA reagents for 3 HLA-AB typing tests)
 - Lymphotype HLA-B27 common (6 microplates **MP** for 30 HLA-B27 determinations)
 - Lymphotype HLA-B27 special (6 microplates **MP** for 18 HLA-B27 determinations)
 - Lymphotype HLA-B5 (6 microplates **MP** for 36 HLA-B5 determinations)
 - Lymphotype HLA-DR/DQ 60 or 72 (6 microplates **MP** with 60 or 72 anti-HLA reagents for 6 HLA-DR/DQ typing tests)
- 2 x 2 ml lyophilized complement **COMP** (rabbit) in each Lymphotype HLA package, non-toxic to human lymphocytes
- Worksheets for each typing (enclosed)
- 1 reaction pattern chart (enclosed)

FOR REFERENCE USE ONLY: DO NOT USE in place of package inserts provided with each product.

Additional materials required

- 1.* Hanks Solution (free from Ca^{++} and Mg^{++})
- 2.* Lymphoflot (density gradient for the isolation of lymphocytes, density 1.077 g/ml)
- 3.* Lymphostabil (McCoy's Medium 5A, modified according to Park and Terasaki, free from Ca^{++} and Mg^{++} , for storage of lymphocytes)
4. Fetal calf serum (FCS), heat inactivated, e.g. Sigma
5. Nylon wool
6. Eosin Y (dissolved 5 % in distilled water and filtered), e.g. Merck
7. Formaldehyde for histology, 37 %, acid-free (filtered and adjusted to pH 7.2 $\pm$ 0.2 with 0.1 N sodium hydroxide solution), e.g., Merck
8. 2 ml disposable syringe or similar
- 9.* Covering oil
- 10.* Cover slides, 50 x 75 mm
11. Microlitre syringes, e.g., Hamilton (0.05 ml syringe)
12. Volume dispenser, e.g., Hamilton No. PB-600-1
13. Terasaki dispenser, e.g., Hamilton (6x 0.250 ml syringe)
14. Microdispenser for microtest plates, e.g. Greiner
15. Inverse phase contrast microscope

Microlymphocytotoxicity Test Procedure

1. Thaw the microplates [MP] at room temperature (20...24°C) immediately before use. Do not allow to stand for longer than 60 minutes at room temperature. DO NOT REFREEZE!
2. Carefully add 1 μ l of the adjusted lymphocyte suspension to the HLA reagent into each well just under the oil (antigen-antibody reaction) and incubate for
HLA-ABC typing 30 minutes and
HLA-DR/DQ 60 minutes
at room temperature (20...24 °C).
3. 15 minutes before completion of the incubation time, reconstitute the complement [COMP] enclosed with the kit through gentle swirling using the quantity of water stated on the label. DO NOT REFREEZE! DISCARD ANY RESIDUAL COMPLEMENT!
4. Add 5 - 6 μ l of complement [COMP] to each well (lysis of the lymphocytes) and incubate for
HLA-ABC typing 60 minutes and
HLA-DR/DQ 120 minutes
at room temperature (20...24 °C).
5. Add 3 - 4 μ l of 5% Eosin to each well. Incubate for approx. 3 minutes.
6. Fix the reaction by adding 6 - 7 μ l of buffered formaldehyde to each well.
7. If necessary, oil should be added to the microplates [MP].
8. Cover the completed microplates [MP] with a cover slip and read the results at least 30 minutes after completion of the test. Since lysed lymphocytes sediment more slowly than viable lymphocytes we recommend to reread the microplates [MP] after 12-24 hours.
If stored at 2 ...8 °C, the test result can still be assessed for up to 3 days afterwards. Read the tray in the following serpentine pattern which corresponds to the worksheet. 1A through 1F; 2F through 2A; 3A through 3F; etc.

Quality control

Negative control: The negative control is used to test the viability of the lymphocyte suspension used. Other reactions in the tray are scored by evaluating the viability compared to this negative control, which should be negative. If the negative control is weakly positive, it must be taken into account during evaluation.

Positive control: The positive control is used to check the complement activity. The positive control should produce 81 - 100 % lysed lymphocytes.

Anti-B-lymphocyte control (only in Lymphotype HLA-DR/DQ): The anti-B-lymphocyte control is in well 1C. This control is used to check the purity of the B-lymphocyte suspension.

Anti-T-lymphocyte control (only in Lymphotype HLA-DR/DQ): The anti-T-lymphocyte control is in well 1D. This control is used to check the separation of the isolated T- and B-lymphocytes.

The anti-B-lymphocyte control should produce at least 81-100 % lysed lymphocytes and the anti-T-lymphocyte control should produce less than 20 % lysed cells. If these values are not achieved, the separation of T- and B-lymphocytes was incomplete. The test should be repeated.

Results

The reactions are read under an inverse phase contrast microscope. Vital lymphocytes appear bright and luminous (= negative reaction), lysed lymphocytes appear somewhat larger and stained dark (= positive reaction). The number of lysed lymphocytes compared with the total number of lymphocytes is quoted as a score value in each well.

% lysed cells		Evaluation	
0 - 10 %	=	Score 1	negative
11 - 20 %	=	Score 2	doubtful negative
21 - 50 %	=	Score 4	weak positive
51 - 80 %	=	Score 6	positive
81 - 100 %	=	Score 8	strong positive
	=	Score 0	not readable

Following recording of the results, identify the antigens which are present on the lymphocyte preparation being tested. Positive reactions occur where antigens correspond to antibody present in the antisera.

Limitations

Causes of false negative or weak reactions:

- Erythrocyte contamination can make microscopic evaluation difficult because of visual confusion with negative lymphocytes.
- Platelet contamination can deplete antibody and complement.
- Lymphocyte count is too high. Cell concentration is important since the test is standardized using a certain antigen-antibody-ratio.
- Yellow colour of the anti-HLA reagents is an indication of bacterial contamination or change of pH value (dry ice!).
- Opened packages or individual plates have been stored together with dry ice.
- Microplates [MP] have been thawed and refrozen.
- Reconstituted complement [COMP] kept too long at room temperature (20...24 °C) before use.
- Residual complement [COMP] was frozen and thawed.
- Incubation times were reduced.
- Incubation temperature was too low. The microlymphocytotoxicity test is temperature dependent.

Causes of false positive reactions:

- Because of similar molecular structures, HLA antigens can react with anti-HLA reagents of other specificities (cross-reaction).
- Incubation temperature was too high.
- Incubation times were too long.
- Prior damage to the lymphocytes = negative control is positive.
- Failure to add fixative.

Expected Values

The phenotype frequencies for HLA Class I and Class II will vary among different populations (8).

Specific Performance Characteristics

Specificity and reaction strength of the anti-HLA reagents

All anti-HLA reagents selected for Biotest Lymphotype HLA have a defined specificity. They have been tested for specificity and reaction strength against several panels of freshly isolated or frozen HLA-typed lymphocytes.

The selected anti-HLA reagents have shown positive reactions (Score 4-8) with lymphocytes which have been demonstrated to carry the relevant antigen. Multispecific antibodies are used only if no monospecific ones are available for a particular specificity.

The selected anti-HLA reagents have shown negative reactions (Score 1-2) with lymphocytes which have been demonstrated not to carry the relevant antigen.

Every batch of Lymphotype HLA is tested with an adequate number of well-defined lymphocyte suspensions. The proportion of false positive or false negative reactions must not be greater than 10% in relation to all possible reactions. Typing tests performed using Lymphotype HLA provided unambiguous results.

The **negative control** consists of serum of a healthy male donor with blood group AB and showed no cytotoxic reactions in the microlymphocytotoxicity test with randomly selected donor lymphocytes.

The **positive control** is an anti-lymphocyte serum from rabbit which reacts cytotoxically with all human lymphocytes.

The **anti-B-lymphocyte control** is a monoclonal antibody (clone Tü 35, isotype IgG2a) which reacts cytotoxically with B-lymphocytes. It does not react with T-lymphocytes, granulocytes, platelets, monocytes or erythrocytes.

The **anti-T-lymphocyte control** is a monoclonal antibody (clone 12F6, isotype IgG2a) which reacts cytotoxically with T-lymphocytes. It is directed against the pan-T-cell antigen CD3 which is expressed exclusively on all T-lymphocytes and not on B-lymphocytes, granulocytes, macrophages or erythrocytes.

Literatur

1. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am.J.Clin.Pathol 69: 103-120, 1978
2. Danilovs, J., Terasaki, P.I., Park, M.S., Ayoub, G.: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. In Histocompatibility Testing 1980. Terasaki P.I. Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 287-288, 1980
3. Mueller-Eckhardt, G.: Serologischer Nachweis von HLA-Antigenen und HLA-Antikörpern. Infusionsther. Transfusionsmed. 21:192- 197, 1994
4. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
5. Middleton, D., Bodmer, J., Heyes, J., Marsh, S.: HLA typing reagents: alloantiera and monoclonal antibodies, in: Histocompatibility Testing - A Practical Approach, eds. P.Dyer, D.Middleton, Oxford University Press, 1992
6. Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H.A., Fauchet, R., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Sveigaard, A., Terasaki, P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 49: 297-321, 1997
7. Tiwari, J.L., Terasaki, P.I.: HLA and Disease Associations, Springer Verlag 1985
8. HLA 1991: Proceeding of the 11th International Workshop and Conference, Eds. Kimiyoshi Tsuji, Miki Aizawa, Takihiro Sasazuki, Oxford University Press, 1992
9. Mittal, K.K.: Standardization of the HLA Typing Method and Reagents. Vox Sang. 34: 58-63, 1978

* can be supplied by Biotest

Lymphotype HLA

Zum Nachweis von humanen HLA-Antigenen

Handelsform

	(4)	823 020	HLA-ABC 72
	(4)	823 023	HLA-AB 72 AN
	(4)	823 028	HLA-AB 72 oriental
	(4)	823 030	HLA-ABC 120
	(4)	823 031	HLA-AB 120 special
	(4)	823 045	HLA-ABC 144 italia
	(4)	823 070	HLA-AB 144
	(4)	823 100	HLA-DR/DQ 60
	(4)	823 102	HLA-DR/DQ 72
	(4)	823 110	HLA-B27 special
	(4)	823 111	HLA-B27 common
	(4)	823 115	HLA-B5
		Mikrotestplatte	
		Komplement	
		Reagenz nur zur in-vitro-Diagnostik	

Verwendungshinweis

Biotest Lymphotype HLA wird zur in-vitro-Diagnostik von humanen HLA-Antigenen im komplementabhängigen Mikrolymphozytotoxizitätstest eingesetzt (1,2,3,4,6,9). Biotest Lymphotype HLA ist eine gebrauchsfertige Mikrotestplatte mit vorgetropften Anti-HLA-Reagenzien. Anti-HLA-Reagenzien können monoklonale HLA-Antikörper oder humane, polyklonale HLA-Antiseren sein (5). Lymphotype HLA-B27 wird zum Nachweis des HLA-B27-Antigens eingesetzt. Da HLA-B27 weltweit streng mit der ankylosierenden Spondylitis assoziiert ist, wird es mit zur Diagnostik dieser Erkrankung herangezogen (7). Lymphotype HLA-B5 wird zum Nachweis der HLA-B5 Antigene eingesetzt.

Die Anordnung und Spezifität der vorgetropften Anti-HLA-Reagenzien ist den Worksheets, die jeder Lieferung beigelegt werden, zu entnehmen. Antikörper mit gleicher Spezifität aber unterschiedlicher ID-Nummer stammen von verschiedenen Spendern und dienen der besseren Absicherung der Befunde.

Einleitung

HLA-Antigene sind membranständige Glykoproteine. Sie werden in zwei Klassen unterteilt. Antigene der Klasse I (HLA-ABC) sind auf fast allen kernhaltigen Zellen nachzuweisen. Antigene der Klasse II (HLA-DR/DQ) sind nur auf der Oberfläche einiger weniger Zellpopulationen zu finden. Alle im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten tragen HLA-ABC-Antigene. B-Lymphozyten besitzen zusätzlich DR/DQ-Antigene. Für eine HLA-ABC-Typisierung kann entweder eine Gesamtlymphozytenpopulation oder eine T-Lymphozytenpopulation eingesetzt werden. Für eine DR/DQ-Typisierung muss eine Anreicherung von B-Lymphozyten erfolgen, da diese nur einen Anteil von etwa 10-15% der gesamten Lymphozytenpopulation darstellen.

Prinzip des Mikrolymphozytotoxizitätstestes

Für die Bestimmung von HLA-Antigenen werden HLA-Antikörper bekannter Spezifität in Gegenwart von Komplement mit einer Lymphozytensuspension des Probanden inkubiert.

Nach der Zugabe der Lymphozyten des Probanden auf Lymphotype HLA kommt es im Falle der Anwesenheit des korrespondierenden Antikörpers und in Gegenwart von Komplement zur Lyse der Lymphozyten. Diese wird mit einem Farbstoff (z.B. Eosin) sichtbar gemacht. Die Beurteilung der lysierten und vitalen Lymphozyten erfolgt mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop.

Produktbeschreibung

Biotest Lymphotype HLA enthält humane, polyklonale HLA-Antiseren oder monoklonale Antikörper beschriebener Spezifität zur Bestimmung von HLA-Klasse I oder HLA-Klasse II Antigenen. Die monoklonalen Antikörper können von der Maus oder humanen Ursprungs sein. Je Kavität sind 1 µl Anti-HLA-Reagenz und 6-8 µl Decköl vorgelegt. Jede Lymphotype HLA-ABC enthält eine Negativ- und eine Positivkontrolle. Jede Lymphotype HLA-DR/DQ enthält zusätzlich eine Anti-B-Lymphozyten- und eine Anti-T-Lymphozytenkontrolle. Die Anordnung der einzelnen Anti-HLA-Reagenzien ist den beigelegten Worksheets zu entnehmen. Die Anti-HLA-Reagenzien sind zur besseren makroskopischen Kontrolle und zur pH-Kontrolle mit Phenolrot angefärbt und mit Natriumazid (0,095 %) konserviert.

Vorsichtsmaßnahmen

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen. Alle für dieses Produkt verwendeten Materialien humanen Ursprungs wurden auf HB_sAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 geprüft und erwiesen sich als nicht reaktiv. Jedoch sollten alle Produkte humanen Ursprungs als potentielle Überträger von Hepatitis, HIV oder anderen infektiösen Krankheitserregern betrachtet werden. Angemessene Sicherheitsvorkehrungen werden empfohlen. Benutzte  sollten als potentiell infektiös gehandhabt werden und entsprechend der gültigen nationalen Richtlinien entsorgt werden.

Lagerung

 und das beigelegte, lyophilisierte  sind jeweils bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum verwendbar. Lymphotype HLA muß bei -20°C oder kälter gelagert werden. Die in Trockeneis angelieferten Packungen sollten **unmittelbar** in die -20°C oder kältere Lagerung überführt werden. Geöffnete Lymphotype HLA-Packungen dürfen nicht gemeinsam mit Trockeneis gelagert werden. Aufgetaute  sollten innerhalb von 60 Minuten für den Test eingesetzt werden und **dürfen nicht wieder eingefroren werden!**

Warnhinweis

Eine gelbe Verfärbung der Anti-HLA-Reagenzien, die auch nach dem Auftauen bestehen bleibt, zeigt eine pH Veränderung an. Derartige  sollten **nicht** für den Test eingesetzt werden.

Probenvorbereitung und Lymphozytenpräparation

Isolierung der Lymphozyten (Dichtegradientenzentrifugation)

1. Ca. 5 ml (10 - 20 ml für eine HLA-DR/DQ-Typisierung) einer frischen, heparinisierten Blutprobe (ca. 10 Einheiten Heparin pro ml Blut) mit dem gleichen Volumen Hanks Solution mischen. Eine Aufbewahrung der Blutprobe ist bei Raumtemperatur (20...24°C) bis 24 Stunden möglich.
2. In einem Zentrifugenröhrchen Lymphoflot (20...24°C) vorlegen und mit gleichem Volumen der verdünnten Blutprobe überschichten, so dass sich Blut und Lymphoflot nicht vermischen.
3. 20 Minuten bei 1000 x g ohne Bremse zentrifugieren.
- Die Lymphozyten setzen sich als weißer Ring an der Grenze zwischen Plasma und Lymphoflot ab. Den Zellring vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettieren, mit Hanks Solution auffüllen und mischen.
4. 10 Minuten bei 230 x g zentrifugieren, Überstand dekantieren, Sediment resuspendieren, mit Hanks Solution auffüllen und mischen.
5. Nochmals 10 Minuten bei 110 x g zentrifugieren, Überstand dekantieren.
6. Für eine HLA-ABC-Typisierung das Lymphozytensediment in Lymphostabil resuspendieren. Die Lymphozytensuspension sollte 2000 - 3000 Lymphozyten/µl enthalten.

Hinweis: Die Isolierung der Lymphozyten ist auch mit immunomagnetischen Beads möglich. Eine Beschreibung der Lymphozytenpräparation und der veränderten Inkubationszeiten sind dem Beipackzettel der Beads zu entnehmen.

Für die Durchführung einer HLA-ABC-Typisierung weiter siehe Punkt "Mikrolymphozytotoxizitätstest". Für die Durchführung einer HLA-DR/DQ-Typisierung weiter siehe Punkt "Trennung in T- und B-Lymphozyten".

Trennung in T- und B-Lymphozyten

1. Eine 2 ml-Einwegspritze oder ähnliches locker mit ca. 0,15 g Nylonwatte stopfen (= Wattesäule). Die Wattesäule mit ca. 20 ml Hanks Solution und ca. 10 ml Medium (Medium = 10% (V / V) FCS in Lymphostabil), jeweils auf 37°C erwärmt, spülen.
2. Die Wattesäule mit Parafilm an beiden Enden verschließen und 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank oder Wasserbad inkubieren. So vorbereitet können Wattesäulen bis zum Gebrauch bei mindestens -20°C gelagert werden. Nach dem Auftauen und Spülen mit auf 37°C erwärmtem Medium sind die Wattesäulen wieder gebrauchsfertig.
3. Lymphozytensediment aus Punkt 5 in 1 ml auf 37°C erwärmtem Medium resuspendieren und auf die Wattesäule geben.
- Wattesäule mit Parafilm verschließen und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
4. Um die Durchflussgeschwindigkeit zu reduzieren, eine Kanüle auf die Wattesäule setzen.
5. Die nicht haftenden T-Lymphozyten mit 10 - 20 ml auf 37°C erwärmter Hanks Solution ausspülen und in einem beschrifteten Zentrifugenröhrchen sammeln.
6. Nach Entfernen der Kanüle B-Lymphozyten mit ca. 2 ml auf 37°C erwärmtem Medium in ein neues Zentrifugenröhrchen eluieren. Mit Hilfe einer Pinzette die Watte vorsichtig zusammendrücken und wieder auflockern. Vorgang 4-5 mal wiederholen.
7. T- und B-Lymphozyten 10 Minuten bei 230 x g zentrifugieren. Überstand dekantieren.
8. T- und B-Lymphozyten mit Lymphostabil resuspendieren und auf eine Zellzahl von 2000 - 3000 Lymphozyten/µl einstellen.

Das Röhrchen mit den T-Lymphozyten zur HLA-ABC-Typisierung und das Röhrchen mit den B-Lymphozyten zur HLA-DR/DQ-Typisierung verwenden.

Methode

vorhandenes Material

1. Jede Packung Lymphotype HLA besteht aus 6  und 2 Fläschchen .
 - Lymphotype HLA-ABC 72 (6  mit 72 Anti-HLA-Reagenzien für 6 HLA-ABC-Typisierungen)
 - Lymphotype HLA-AB 72 (6  mit 72 Anti-HLA-Reagenzien für 6 HLA-AB-Typisierungen)
 - Lymphotype HLA-ABC 120 bzw. 144 (3 x 2  mit 120 bzw. 144 Anti-HLA-Reagenzien für 3 HLA-ABC-Typisierungen)
 - Lymphotype HLA-AB 120 bzw. 144 (3 x 2  mit 120 oder 144 Anti-HLA-Reagenzien für 3 HLA-AB-Typisierungen)
 - Lymphotype HLA-B27 common (6  für 30 HLA-B27-Bestimmungen)
 - Lymphotype HLA-B27 special (6  für 18 HLA-B27-Bestimmungen)
 - Lymphotype HLA-B5 (6  für 36 HLA-B5-Bestimmungen)
 - Lymphotype HLA-DR/DQ 60 bzw. 72 (6  mit 60 bzw. 72 Anti-HLA-Reagenzien für 6 HLA-DR/DQ-Typisierungen)
2. Jede Packung Lymphotype HLA enthält 2 x 2 ml  (lyophilisiert, nicht-toxisch für menschliche Lymphozyten, vom Kaninchen)
3. Worksheets, entsprechend der Anzahl der Typisierungen (beigelegt)
4. 1 Reaction Pattern Chart (beigelegt)

Zusätzlich erforderliches Material

1. Hanks Solution (Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-frei)
2. Lymphoflot (Dichtegradient zur Isolierung von Lymphozyten, Dichte 1,077g/ml)
3. Lymphostabil (McCoy's Medium 5A, modifiziert nach Park und Terasaki, Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-frei, zur Lagerung von Lymphozyten)
4. Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert, z.B. Fa.Sigma
5. Nylonwatte
6. Eosin Y (5%ig in Aqua dest. lösen und filtrieren), z.B. Fa.Merck
7. Formaldehyd für die Histologie, 37%ig, säurefrei (filtrieren und pH 7,2 ± 0,2 mit 0,1 N Natronlauge einstellen), z.B.Fa. Merck
8. 2 ml-Einmalspritze oder ähnliches
9. Decköl
10. Deckgläser, 50 x 75 mm
11. Mikroliterspritzen, z.B. Fa. Hamilton (0,05 ml Spritze)
12. Dosiervorrichtung, z.B. Fa. Hamilton Nr. PB-600-1
13. Terasaki-Dispenser, z.B. Fa. Hamilton (6x0,250 ml Spritze)
14. Mikrodispenser für Mikrottestplatten, z.B. Fa. Greiner
15. Inverses Phasenkontrastmikroskop

Mikrolymphozytotoxizitätstest

1. Die [MP] unmittelbar vor Gebrauch bei Raumtemperatur (20...24°C) auftauen. Nicht länger als 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. NICHT WIEDER EINFRIEREN!
2. 1 µl der eingestellten Lymphozytensuspension in jede Kavität unter das Öl pipettieren (Antigen-Antikörper-Reaktion).

HLA-ABC-Typisierung	30 Minuten und
HLA-DR/DQ-Typisierung	60 Minuten

bei Raumtemperatur (20...24°C) inkubieren.
3. 15 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit das beigelegte [COMP] mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen destillierten Wassers unter leichtem Schwenken rekonstituieren. NICHT WIEDER EINFRIEREN! KOMPLEMENT-REST VERWERFEN!
4. 5-6 µl [COMP] je Kavität zugeben (Lyse der Lymphozyten).

HLA-ABC-Typisierung	60 Minuten und
HLA-DR/DQ-Typisierung	120 Minuten

bei Raumtemperatur (20...24°C) inkubieren.
5. Mit 3-4 µl 5%igem Eosin je Kavität die Zellen ca. 3 Minuten anfärben.
6. Mit 6-7 µl Formaldehyd je Kavität die Reaktionen fixieren.
7. Bei Bedarf die [MP] zusätzlich ölen.
8. Die fertigen [MP] mit einem Deckglas abdecken und frühestens 30 Minuten nach Beendigung des Tests ablesen. Da lysierte Lymphozyten langsamer sedimentieren als vitale Lymphozyten, empfiehlt es sich die [MP] nach 12-24 Stunden nachzulesen. Bei Aufbewahrung bei 2...8°C ist eine Beurteilung noch bis zu 3 Tagen möglich. Das Ablesen erfolgt entsprechend der beigelegten Worksheets mäanderförmig; von 1A nach 1F, von 2F nach 2A, von 3A nach 3F usw.

Qualitätskontrolle

Negativkontrolle: Mit der Negativkontrolle wird die Vitalität der eingesetzten Lymphozytensuspension überprüft. Die Negativkontrolle sollte negativ sein. Alle Reaktionen einer Platte werden im Vergleich zur Bewertung der Negativkontrolle beurteilt. Ist diese schwach positiv, so ist dies bei der Beurteilung zu berücksichtigen.

Positivkontrolle: Die Positivkontrolle überprüft die Komplementaktivität. Die Positivkontrolle sollte 81-100 % lysierte Lymphozyten ergeben.

Anti-B-Lymphozytenkontrolle (nur in Lymphotype HLA-DR/DQ): Die Anti-B-Lymphozytenkontrolle befindet sich in der Position 1C. Die Kontrolle wird zur Bestimmung der Reinheit der B-Lymphozytensuspension eingesetzt.

Anti-T-Lymphozytenkontrolle (nur in Lymphotype HLA-DR/DQ): Die Anti-T-Lymphozytenkontrolle befindet sich in der Position 1D. Mit dieser Kontrolle wird die Trennung der isolierten Lymphozyten in T- und B-Lymphozyten überprüft.

Die Anti-B-Lymphozytenkontrolle sollte 81-100% lysierte Lymphozyten und die Anti-T-Lymphozytenkontrolle sollte weniger als 20 % lysierte Zellen ergeben. Werden diese Werte nicht erreicht, so war die Trennung in T- und B-Lymphozyten unvollständig. Der Test sollte wiederholt werden.

Bewertung der Reaktionen

Die Ablesung erfolgt mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop. Vitale Lymphozyten sind hell und leuchtend (=negative Reaktion), lysierte Lymphozyten sind dunkel und größer (=positive Reaktion). Der Anteil der lysierten Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl wird als Scorewert angegeben.

% lysierte Zellen	Bewertung
0 - 10 %	Score 1 negativ
11 - 20 %	Score 2 fraglich negativ
21 - 50 %	Score 4 schwach positiv
51 - 80 %	Score 6 positiv
81 - 100 %	Score 8 stark positiv
	Score 0 nicht ablesbar

Das Ergebnis besteht in dem Nachweis der HLA-Antigene, die sich auf den Lymphozyten der untersuchten Probe befinden. Positive Reaktionen treten auf, wo die Spezifität des Antigens mit der des Antikörpers übereinstimmt.

Fehlermöglichkeiten

Ursache falsch negativer oder schwacher Reaktionen:

- Erythrozyten können das Ablesen erschweren, da sie unter dem Mikroskop kaum von den vitalen Lymphozyten zu unterscheiden sind.
- Eine hohe Kontamination mit Thrombozyten führt zur Verringerung des Antikörper- und Komplementgehaltes, da sie mit den Lymphozyten um den Antikörper konkurrieren.
- Die Lymphozytenzahl ist zu hoch. Die Zellkonzentration ist wichtig, da der Test für ein bestimmtes Antigen-Antikörper-Verhältnis standardisiert ist.
- Gelbfärbung der Anti-HLA-Reagenzien ist ein Hinweis auf bakterielle Kontamination oder pH-Veränderung (Trockeneis!).
- Geöffnete Packungen oder einzelne Platten wurden gemeinsam mit Trockeneis gelagert.
- Die [MP] wurde aufgetaut und wieder eingefroren.
- Gelöstes [COMP] wurde zu lange vor Verwendung bei Raumtemperatur (20...24°C) gelagert.
- Reste des aufgelösten [COMP] wurden wieder eingefroren und erneut verwendet.
- Die Inkubationszeiten sind zu kurz.
- Die Inkubationstemperatur ist zu niedrig. Der Mikrolymphozytotoxizitätstest ist ein temperaturabhängiger Test.

Ursache falsch positiver Reaktionen:

- Aufgrund ähnlicher molekularer Strukturen können HLA-Antigene mit Anti-HLA-Reagenzien fremder Spezifität reagieren (Kreuzreaktivität).
- Die Inkubationstemperatur ist zu hoch.
- Die Inkubationszeiten sind zu lang.
- vorgeschädigte Lymphozyten = Negativkontrolle ist positiv
- Die Reaktionen wurden nicht abgestoppt.

Erwartete Ergebnisse

Die Phänotypfrequenzen für Klasse I und Klasse II variieren zwischen den verschiedenen Populationen (8).

Spezifische Charakterisierung

Spezifität und Reaktionsstärken der Anti-HLA-Reagenzien

Alle für Biotest Lymphotype HLA ausgewählten Anti-HLA-Reagenzien haben eine definierte Spezifität. Sie wurden gegen mehrere Panel frisch isolierter oder tiefgefrorener HLA-typisierter Lymphozyten auf Spezifität und Reaktionsstärke getestet.

Die ausgewählten Anti-HLA-Reagenzien reagierten mit den Lymphozyten, die das Antigen nachweislich tragen, positiv (Score 4-8). Multispezifische Antikörper werden nur eingesetzt, wenn für die entsprechende Spezifität keine monospezifischen zur Verfügung stehen.

Die ausgewählten Anti-HLA-Reagenzien reagierten mit den Lymphozyten, die das Antigen nachweislich nicht tragen, negativ (Score 1-2).

Jede Charge von Lymphotype HLA wird mit einer ausreichenden Anzahl gut definierter Lymphozytensuspensionen getestet. Der Anteil der falsch positiven bzw. falsch negativen Reaktionen darf 10 %, bezogen auf die Anzahl der möglichen Gesamtreaktionen, nicht übersteigen. Die mit Lymphotype HLA durchgeführten Typisierungen ergaben eindeutige Ergebnisse.

Die **Negativkontrolle** ist Serum eines gesunden männlichen Spenders mit der Blutgruppe AB und zeigte keine zytotoxischen Reaktionen im Mikrolymphozytotoxizitätstest mit unausgewählten Spenderlymphozyten.

Die **Positivkontrolle** ist ein Anti-Lymphozytenserum vom Kaninchen, das zytotoxisch mit allen humanen Lymphozyten reagiert.

Die **Anti-B-Lymphozytenkontrolle** ist ein monoklonaler Antikörper (Clon Tü35, Isotype IgG2a), der zytotoxisch mit B-Lymphozyten reagiert. Er reagiert nicht mit T-Lymphozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Monozyten und Erythrozyten.

Die **Anti-T-Lymphozytenkontrolle** ist ein monoklonaler Antikörper (Clon 12F6, Isotype IgG2a), der zytotoxisch mit T-Lymphozyten reagiert. Er ist gegen das Pan-T-Zell-Antigen CD3 gerichtet, das exclusiv auf allen T-Lymphozyten ausgeprägt ist und nicht auf B-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten.

Literatur

1. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am.J.Clin Pathol 69: 103-120, 1978
2. Danilovs, J., Terasaki, P.I., Park, M.S., Ayoub, G.: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. In Histocompatibility Testing 1980. Terasaki P.I. Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 287-288, 1980
3. Mueller-Eckhardt, G.: Serologischer Nachweis von HLA-Antigenen und HLA-Antikörpern. Infusionsther. Transfusionsmed. 21:192- 197, 1994
4. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
5. Middleton, D., Bodmer, J., Heyes, J., Marsh, S.: HLA typing reagents: alloantigen and monoclonal antibodies, in: Histocompatibility Testing - A Practical Approach, eds. P.Dyer, D.Middleton, Oxford University Press, 1992
6. Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H.A., Fauchet, R., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Sveigaard, A., Terasaki, P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 49: 297-321, 1997
7. Tiwari, J.L., Terasaki, P.I.: HLA and Disease Associations, Springer Verlag 1985
8. HLA 1991: Proceeding of the 11th International Workshop and Conference, Eds. Kimiyoshi Tsuji, Miki Aizawa, Takihiko Sasazuki, Oxford University Press, 1992
9. Mittal, K.K.: Standardization of the HLA Typing Method and Reagents. Vox Sang. 34: 58-63, 1978

Lymphotype HLA

Pour la détermination des antigènes HLA chez l'homme

Conditionnement

[REF] ⁽⁴⁾	823 020	HLA-ABC 72
[REF] ⁽⁴⁾	823 023	HLA-AB 72 AN
[REF] ⁽⁴⁾	823 028	HLA-AB 72 oriental
[REF] ⁽⁴⁾	823 030	HLA-ABC 120
[REF] ⁽⁴⁾	823 031	HLA-AB 120 special
[REF] ⁽⁴⁾	823 045	HLA-ABC 144 Italia
[REF] ⁽⁴⁾	823 070	HLA-AB 144
[REF] ⁽⁴⁾	823 100	HLA-DR/DQ 60
[REF] ⁽⁴⁾	823 102	HLA-DR/DQ 72
[REF] ⁽⁴⁾	823 110	HLA-B27 special
[REF] ⁽⁴⁾	823 111	HLA-B27 common
[REF] ⁽⁴⁾	823 115	HLA-B5

[MP]	Microplaque
[COMP]	Complément
[IVD]	Pour le diagnostic in vitro

Remarque concernant l'utilisation

Biotest Lymphotype HLA est utilisé pour la mise en évidence des antigènes HLA classe I et classe II chez l'homme, grâce à des tests de microlymphocytotoxicité, dépendants du complément (1,2,3,4,6,9). Lymphotype Biotest HLA est une microplaque prête à l'emploi, comportant des réactifs anti-HLA prédistribués sur la plaque. Ces réactifs anti-HLA sont soit des anticorps monoclonaux soit des antisérums polyclonaux d'origine humaine (5). Pour mettre en évidence la présence de l'antigène HLA-B27, on utilise le lymphotype HLA-B27. Depuis la mise en évidence, dans le monde entier, d'une étroite association entre l'antigène HLA-B27 et la spondylarthrite ankylosante, cet examen fait partie des méthodes de diagnostic de cette maladie (7). Pour mettre en évidence la présence de l'antigènes HLA-B5, on utilise le lymphotype HLA-B5.

La localisation et la spécificité des réactifs anti-HLA prédistribués sont indiqués sur les documents de travail, joints à chaque livraison. Les anticorps reconnaissant la même spécificité mais ayant un numéro d'identification (ID) différent, proviennent de donneurs différents. Ils permettent ainsi de mieux définir la spécificité HLA concernée.

Introduction

Les antigènes HLA sont des glycoprotéines transmembranaires. Ils appartiennent à deux classes différentes: Les antigènes HLA de classe I (ABC), présents sur toutes les cellules nucléées. Les antigènes HLA de classe II (DR/DQ), qui sont restreints aux cellules présentatrices de l'antigène: lymphocytes B, monocytes, cellules endothéliales, cellules dendritiques. Tous les lymphocytes circulant du sang périphérique expriment les antigènes HLA-ABC. Les lymphocytes B expriment en plus les antigènes DR/DQ.

Pour déterminer les antigènes de classe I (ABC), on utilise soit les lymphocytes totaux, soit les lymphocytes T. Pour déterminer les antigènes de classe II (DR/DQ), on utilise les lymphocytes B. Ces derniers représentent 10 à 15 % de la population lymphocytaire totale; ils sont obtenus après enrichissement.

Principe du test de microlymphocytotoxicité

La détection des antigènes HLA comporte la fixation d'anticorps spécifiques (allo-anticorps ou monoclonaux) sur les lymphocytes. Si les lymphocytes expriment l'antigène reconnu par les sérums spécifiques, l'anticorps se fixe sur l'antigène par sa partie Fab'. Le complexe antigène/anticorps est formé. Le complément de lapin ajouté va se lier à la partie Fc de l'anticorps, initiant une cascade de réactions aboutissant à la lyse des lymphocytes. L'addition d'un colorant vital (éosine) permet l'identification des cellules mortes positives, qui prennent le colorant alors que les cellules vivantes négatives demeurent réfringentes. L'évaluation du pourcentage des lymphocytes lysés et des lymphocytes vivants se fait au microscope inversé à contraste de phase.

Contenu

Lymphotype HLA Biotest contient des antisérums HLA polyclonaux d'origine humaine soit des anticorps monoclonaux spécifiques en vue de déterminer les antigènes HLA de classe I ou de classe II. Les anticorps monoclonaux peuvent être d'origine murine ou humaine.

Chaque puits contient 1 µl de réactif anti-HLA distribué sous 6 à 8 µl d'huile de paraffine (afin d'éviter l'évaporation). Chaque plaque Lymphotype HLA-ABC contient un témoin négatif et un témoin positif. Chaque plaque Lymphotype HLA-DR/DQ contient en plus un témoin anti-lymphocytaire B et un témoin anti-lymphocytaire T. La localisation des différents réactifs anti-HLA est précisée dans la feuille de travail jointe. Les réactifs anti-HLA sont colorés par le rouge phénol pour un meilleur contrôle macroscopique et comportent de l'azide de sodium (0,095%) comme conservateur.

Précaution

Le test doit être réalisé par des techniciens autorisés à faire la technique et bien formés.

Tous les matériaux d'origine humaine, utilisés pour ce produit, ont été contrôlés pour l'AgHBs, les anticorps anti-HCV et anti-HIV-1/2 et ont donné des réactions négatives. Tous ces produits d'origine humaine devront toutefois être considérés comme des transmetteurs potentiels du virus de l'hépatite, du HIV et d'autres agents pathogènes infectieux. Des mesures de précaution appropriées sont recommandées.

Toutes les MP utilisées doivent être considérées comme potentiellement infectieuses et doivent être détruites selon bonnes pratiques nationales en vigueur.

Stockage

[MP] ainsi que le **[COMP]** lyophilisé inclus dans l'emballage sont utilisables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes. Lymphotype HLA doit être conservé à une température inférieure ou égale à -20°C. Les kits emballés livrés dans la carboglace doivent être congelés **immédiatement** à -20°C.

Les plaques des kits de Lymphotype HLA entamés ne doivent pas être stockées directement au contact de la carboglace.

Après décongélation les plaques **[MP]** doivent être utilisées dans les 60 minutes.

Ne pas recongeler les plaques après décongélation.

Contrôle de viabilité des réactifs

Une coloration jaune au niveau des réactifs anti-HLA qui persiste après décongélation indique un changement de la valeur du pH. Ces **[MP]** **ne doivent pas** être utilisées pour le test.

Prélèvement et Préparation des Lymphocytes

Isolement des lymphocytes (centrifugation par gradient de densité)

Le prélèvement sanguin pourra être conservé 24 h à température ambiante (20...24°C).

- Mélanger environ 5 ml (10 à 20 ml pour un typage HLA DR/DQ d'un prélèvement sanguin hépariné (environ 10 unités/ml) fraîchement prélevé avec le même volume de solution de Hanks.
- Mettre du Lymphoflot dans un tube à centrifuger et déposer délicatement dessus le même volume du sang dilué au ½ de façon à ne pas mélanger le sang et le Lymphoflot.
- Centrifuger pendant 20 minutes à 1000 xg sans freinage. Les lymphocytes se trouvent dans l'anneau blanc de cellules mononucléées entre le plasma et le Lymphoflot. Pipeter avec précaution l'anneau cellulaire dans un nouveau tube, compléter avec de solution de Hanks et mélanger.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 230 xg, rejeter le surnageant, resuspendre le culot, compléter avec de solution de Hanks et mélanger.
- Centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 110 xg, rejeter le surnageant.
- Remettre en suspension le culot lymphocytaire dans Lymphostabil pour un typage HLA-ABC. Ajuster la suspension à 2000 à 3000 lymphocytes/µl.

Remarque: Les lymphocytes peuvent également être isolés à l'aide de billes immuno-magnétiques. Une description de la préparation des lymphocytes et des durées d'incubation modifiées figure dans la notice de conditionnement des Beads.

Voir chapitre "Test de microlymphocytotoxicité" pour la réalisation d'un typage HLA-ABC. Voir chapitre "Séparation des lymphocytes T et B" pour la réalisation d'un typage HLA-DR/DQ.

Séparation des lymphocytes T et B

- Placer sans la tasser 0,15 g de fibre de nylon dans une seringue de 2 ml à usage unique ou dans une seringue analogue (= colonne de cellulose). Rincer la fibre avec 20 ml de solution de Hanks ou 10 ml de milieu (milieu = Lymphostabil + 10% de SVF préchauffé à 37°C).
- Fermer la colonne de fibre de nylon aux deux extrémités par du parafilm, la mettre à l'étuve 30 minutes à 37°C. Les colonnes ainsi préparées peuvent être conservées à -20°C. Au moment de l'utilisation, les décongeler et les rincer avec du milieu préchauffé à 37°C.
- Utiliser le culot lymphocytaire remis en suspension dans 1 ml de milieu préchauffé à 37°C (paragraphe 5).
- Ajouter cette suspension cellulaire goutte à goutte en laissant imprégner la fibre, puis reboucher l'extrémité inférieure et l'extrémité supérieure de la seringue au moyen du piston. Mettre la seringue dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes.
- Recueillir les lymphocytes T non adhérents au moyen de 10 à 20 ml de solution de Hanks préchauffée à 37°C; recueil se fait lentement dans un tube à centrifugation étiqueté.
- Eluer les lymphocytes B au moyen de 2 ml de milieu préchauffé à 37°C dans un nouveau tube à centrifugation. Comprimer doucement la cellulose avec le piston, laisser la colonne reprendre son volume initial. Répéter ce processus 4 à 5 fois.
- Centrifuger les suspensions contenant les lymphocytes T et B 10 minutes à 230 xg. Rejeter le surnageant.
- Resuspendre les culots de lymphocytes T et B dans du Lymphostabil, le volume est adapté aux culots obtenus. Numérer les lymphocytes T et B et ramener à 2000 à 3000 cellules par microlitre.

Utiliser le tube contenant les lymphocytes T pour le typage HLA-ABC et le tube contenant les lymphocytes B pour le typage HLA-DR/DQ.

Mode opérateur

Matériel existant

- Ce conditionnement de Lymphotype HLA est composé de 6 **[MP]** et de 2 flacons de **[COMP]**.
 - Lymphotype HLA-ABC 72 (6 **[MP]** comportant 72 réactifs anti-HLA pour 6 typages ABC).
 - Lymphotype HLA-AB 72 (6 **[MP]** comportant 72 réactifs anti-HLA pour 6 typages AB)
 - Lymphotype HLA-ABC 120 ou 144 (3 x 2 **[MP]** comportant 120 ou 144 réactifs anti-HLA pour 3 typages ABC)
 - Lymphotype HLA-AB 120 ou 144 (3 x 2 **[MP]** comportant 120 ou 144 réactifs anti-HLA pour 3 typages AB)
 - Lymphotype HLA-B27 common (6 **[MP]** pour 30 déterminations du groupe B27)
 - Lymphotype HLA-B27 special (6 **[MP]** pour 18 déterminations du groupe B27)
 - Lymphotype HLA-B5 (6 **[MP]** pour 36 déterminations du groupe B5)
 - Lymphotype HLA-DR/DQ 60 ou 72 (6 **[MP]** comportant 60 ou 72 réactifs anti-HLA pour 6 typages DR/DQ)
- 2 x 2 ml de **[COMP]** de lapin lyophilisé, non cytotoxique pour les lymphocytes humains.
- Feuilles de travail (joints en annexe)

4. 1 Profil Réactionnel (joint en annexe)

Matériel supplémentaire nécessaire, non fourni dans le kit Lymphotype

1. Solution de Hanks (dépourvue de Ca^{++} et de Mg^{++})
2. Lymphoflot (gradient de densité pour l'isolement des lymphocytes, densité de 1,077 g/ml)
3. Lymphostabil (milieu 5A de McCoy, modifié selon Park et Terasaki, dépourvue de Ca^{++} et de Mg^{++} , utilisé pour conserver les lymphocytes)
4. Sérum de veau fœtal (SVF), inactivé par la chaleur, par ex. Société Sigma
5. Fibre de nylon
6. Eosine Y (la préparer à 5 % en eau distillée et filtrer), par ex. Société Merck
7. Formaldéhyde pour examen histologique à 37 %, sans acide (filtrer et ajuster à pH 7.2 ± 0.2 à l'aide de soude 0.1N), par exemple Société Merck
8. Seringue de 2 ml à usage unique ou seringue analogue
9. Huile de paraffine
10. Lamelles de 50 x 75 mm
11. Seringue Hamilton, graduée en microlitres (0,050 ml seringue)
12. Distributeur répétitif de fluide, Société Hamilton n° PB-600-1
13. Distributeur de Terasaki, société Hamilton (6 x 0,250 ml seringues)
14. Microdistributeur pour microplaques, par exemple Société Greiner
15. Microscope inversé à contraste de phase

Test de microlymphocytotoxicité

1. Décongeler [MP] au moment de l'utilisation, à température ambiante. Ne pas le laisser plus de 60 minutes à température ambiante. NE PAS RECONGELER!
2. Distribuer 1 µl de la suspension lymphocytaire ajustée dans chaque puits contenant l'antisérum (réaction antigène-anticorps). Incuber à température ambiante (20...24°C)
Type HLA-ABC 30 minutes et
Type HLA-DR/DQ 60 minutes
3. 15 minutes avant la fin de l'incubation, reconstituer le [COMP] fourni à l'aide du volume d'eau distillée, indiqué sur l'étiquette, en agitant légèrement. NE PAS RECONGELER! JETER LE COMPLEMENT RESTANT!
4. Ajouter 5 à 6 µl de complément dans chaque puits (lyse des lymphocytes). Incuber à température ambiante (20...24°C)
Type HLA-ABC 60 minutes et
Type HLA-DR/DQ 120 minutes
5. Colorer les cellules par 3 à 4 µl d'éosine à 5% ajoutés dans chaque puits. Laisser 3 minutes.
6. Fixer les réactions par 6 à 7 µl de formaldéhyde tamponnée ajoutés dans chaque puits.
7. Si nécessaire, ajouter un peu d'huile.
8. Déposer sur la [MP] une lamelle, attendre au moins 30 minutes pour lire les plaques. L'évaluation de la réaction est encore possible dans un délai pouvant aller jusqu'à trois jours (conservation à 2...8°C). Les lymphocytes lysés sédimentent plus lentement que les lymphocytes vivants, nous recommandons de relire les [MP] après 12 à 24 heures. Lire les plaques suivant le dessin en serpent qui correspondent aux feuilles de travail: 1A vers 1F, 2F vers 2A, 3A vers 3F, etc.

Contrôle de qualité

Témoin négatif: Le témoin négatif permet de contrôler la viabilité des suspensions lymphocytaires utilisées. Le témoin négatif devra être négatif. Si ce témoin est faiblement positif, il convient d'en tenir compte lors de l'interprétation.

Témoin positif: Le témoin positif permet de vérifier l'activité du complément. Le témoin positif devra avoir au moins 81 - 100 % de lymphocytes lysés.

Témoin anti-lymphocytaire B (Lymphotype HLA-DR/DQ): Le témoin anti-lymphocytaire B se trouve dans la position 1C. Ce témoin est utilisé pour vérifier la pureté de la suspension des lymphocytes B.

Témoin anti-lymphocytaire T (Lymphotype HLA-DR/DQ): Le témoin anti-lymphocytaire T se trouve dans la position 1D. Ce témoin permet de contrôler la séparation des lymphocytes en lymphocytes T et lymphocytes B.

Le témoin anti-lymphocytaire B devra entraîner une lyse de 81 à 100 % des lymphocytes et le témoin anti-lymphocytaire T une lyse de moins de 20 % des lymphocytes. Si ces valeurs ne sont pas atteintes, la séparation des lymphocytes T et B était incomplète. Répéter le test.

Interprétation des réactions

Les plaques sont lues au microscope inversé à contraste de phase. Les lymphocytes vivants ont une couleur claire et sont brillants (= réaction négative), alors que les lymphocytes lysés sont colorés foncés et de plus grande dimension (= réaction positive). Le pourcentage de lymphocytes lysés sur le nombre total de lymphocytes est indiqué en score.

% de cellules lysées			Interprétation		
0	-	10 %	=	Score 1	négatif
11	-	20 %	=	Score 2	négatif douteux
21	-	50 %	=	Score 4	faiblement positif
51	-	80 %	=	Score 6	positif
81	-	100 %	=	Score 8	fortement positif
				Score 0	non interprétable

Suivant les résultats obtenus, identifier les antigènes présents sur les lymphocytes de la suspension testée. Une réaction positive se produit quand les antigènes correspondent aux anticorps présents dans les anti-sérums.

Source d'erreurs

* pouvant être fourni par Biotest

Cause des réactions faussement négatives ou faibles :

- Une contamination par des érythrocytes peut rendre la lecture difficile du fait d'une confusion possible avec les lymphocytes négatifs.
- Une contamination par des plaquettes peut réduire l'activité de l'anticorps et du complément.
- Numération de lymphocytes trop élevée. La concentration en cellules est importante dans la mesure où le test est standardisé pour un certain ratio antigène-anticorps.
- Une coloration jaune des sérums est signe d'une contamination bactérienne ou de modification du pH (causée par la carboglace, par exemple.)
- Emballages entamés ou plaques isolées conservées directement en contact avec la carboglace.
- Décongélation et recongélation des [MP].
- [COMP] dissous conservé trop longtemps à la température ambiante (20...24°C) avant emploi.
- Recongélation et nouvelle utilisation du [COMP] dissous restant.
- Durée d'incubation raccourcie.
- Température d'incubation trop faible. Le test de microlymphocytotoxicité est dépendant de la température.

Causes des réactions faussement positives :

- Du fait d'épitopes moléculaires partagés, des antigènes peuvent présenter une réaction avec des réactifs anti-HLA de spécificité étrangère (réactivité croisée).
- Température d'incubation trop élevée.
- Durée d'incubation trop prolongée.
- Lymphocytes préalablement lysés (témoin négatif positif).
- Le fixateur n'a pas été ajouté.

Valeurs attendues

Les fréquences phénotypiques HLA classe I et classe II varient suivant les différentes populations (8).

Contrôle de qualité

Spécificité et intensité des réactions obtenues à l'aide des réactifs anti-HLA

Tous les réactifs anti-HLA, choisis pour Lymphotype HLA Biotest, ont une spécificité définie. La spécificité et l'intensité de la réaction de ces réactifs ont été contrôlées à l'aide de plusieurs panels de lymphocytes fraîchement isolés ou congelés bien définis pour les marqueurs HLA.

Les réactifs anti-HLA choisis ont présenté une réaction positive avec les lymphocytes porteurs de l'antigène (score 4-8).

Les réactifs anti-HLA choisis ont présenté une réaction négative (score 1-2) avec les lymphocytes ne portant pas l'antigène.

Chaque lot de Lymphotype HLA est testé avec un nombre adéquat de suspensions de lymphocytes aux typages bien définis. Le pourcentage des réactions faussement positives ou faussement négatives ne devra pas dépasser 10%. Les typages réalisés à l'aide de Lymphotype HLA ont fourni des résultats validés et reproductibles.

Le **témoin négatif** est un sérum d'un donneur masculin en bonne santé de groupe sanguin AB et ne présentant pas de réactions cytotoxiques au cours du test de lymphocytotoxicité utilisant des lymphocytes non sélectionnés de donneurs.

Le **témoin positif** est un sérum anti-lymphocytaire de lapin qui réagit sur le plan cytotoxique avec tous les lymphocytes d'origine humaine.

Le **témoin anti-lymphocytaire B** est un anticorps monoclonal (clone Tü 35, isotype IgG2a) qui réagit sur le plan cytotoxique avec les lymphocytes B. Il ne réagit pas avec les lymphocytes T, les polynucléaires, les plaquettes, les monocytes et les érythrocytes.

Le **témoin anti-lymphocytaire T** est un anticorps monoclonal (clone 12F6, isotype IgG2a) qui réagit sur le plan cytotoxique avec les lymphocytes T. Il est dirigé contre l'antigène CD3 lymphocytaire PAN-T qui est porté exclusivement par les lymphocytes T et qui est absent sur les lymphocytes B, les polynucléaires, les macrophages et les érythrocytes.

Littérature

1. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am.J. Clin Pathol 69: 103-120, 1978
2. Danilovs, J., Terasaki, P.I., Park, M.S., Ayoub, G.: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. In Histocompatibility Testing 1980. Terasaki P.I. Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 287-288, 1980
3. Mueller-Eckhard, G.: Serologischer Nachweis von HLA-Antigenen und HLA-Antikörpern. Infusionsther. Transfusionsmed. 21:192- 197, 1994
4. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
5. Middleton, D., Bodmer, J., Heyes, J., Marsh, S.: HLA typing reagents: alloantigen and monoclonal antibodies, in: Histocompatibility Testing - A Practical Approach, eds. P.Dyer, D.Middleton, Oxford University Press, 1992
6. Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H.A., Fauchet, R., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Sveigaard, A., Terasaki, P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 49: 297-321, 1997
7. Tiwari, J.L., Terasaki, P.I.: HLA and Disease Associations, Springer Verlag 1985
8. HLA 1991: Proceeding of the 11th International Workshop and Conference, Eds. Kimiyoshi Tsuji, Miki Aizawa, Takihiro Sasazuki, Oxford University Press, 1992
9. Mittal, K.K.: Standardization of the HLA Typing Method and Reagents. Vox Sang. 34: 58-63, 1978



Biotest

Biotest, Industriestr. 1, D-63303 Dreieich,
Germany, www.biotest.de, mail@biotest.de
Tel.: +49-6103-801-0, Fax: +49-6103-801-140



0197

Lymphotype HLA

per la determinazione degli antigeni HLA umani

Confezionamento

[REF] ⁽⁴⁾	823 020	HLA-ABC 72
[REF] ⁽⁴⁾	823 023	HLA-AB 72 AN
[REF] ⁽⁴⁾	823 028	HLA-AB 72 oriental
[REF] ⁽⁴⁾	823 030	HLA-ABC 120
[REF] ⁽⁴⁾	823 031	HLA-AB 120 special
[REF] ⁽⁴⁾	823 045	HLA-ABC 144 Italia
[REF] ⁽⁴⁾	823 070	HLA-AB 144
[REF] ⁽⁴⁾	823 100	HLA-DR/DQ 60
[REF] ⁽⁴⁾	823 102	HLA-DR/DQ 72
[REF] ⁽⁴⁾	823 110	HLA-B27 special
[REF] ⁽⁴⁾	823 111	HLA-B27 common
[REF] ⁽⁴⁾	823 115	HLA-B5

[MP]	Micropiastra
[COMP]	Complemento
[IVD]	Solo per la diagnostica in vitro

Usi

Le Lymphotype Biotest HLA vengono usate per la diagnostica in vitro degli antigeni HLA umani nel test di microlinfocitotossicità complemento-dipendente (1,2,3,4,6,9). Le Lymphotype Biotest HLA sono micropiastrine pronte per l'uso su cui sono stati seminati anticorpi monoclonali anti-HLA e/o antisieri umani policlonali anti-HLA (5). Le Lymphotype HLA-B27 sono usate per rilevare l'antigene HLA-B27. Poiché HLA-B27 è in tutto il mondo strettamente associato alla spondilite anchilosante, esso viene impiegato nella diagnostica di questa malattia (7). Le Lymphotype HLA-B5 sono usate per rilevare l'antigene HLA-B5. La disposizione e la specificità dei reagenti anti-HLA sono riportate nei fogli di lavoro allegati ad ogni confezione. Gli anticorpi con specificità uguale ma con diverso numero di identificazione provengono da donatori diversi.

Introduzione

Gli antigeni HLA sono glicoproteine legate alla membrana. Essi sono suddivisi in due classi: gli antigeni di classe I (HLA-ABC) sono presenti su quasi tutte le cellule nucleate, gli antigeni di classe II (HLA-DR/DQ) sono presenti solo sulla superficie di poche popolazioni cellulari. Tutti i linfociti del sangue circolante possiedono antigeni HLA-ABC. I linfociti B, inoltre, possiedono antigeni DR/DQ. Per una tipizzazione HLA-ABC si può usare una popolazione di linfociti totali oppure una popolazione di linfociti T. Per una tipizzazione DR/DQ deve aver luogo un arricchimento di linfociti B, poiché questi rappresentano solo una parte, pari a circa il 10-15%, della popolazione complessiva di linfociti.

Principio del test di microlinfocitotossicità

Per la determinazione degli antigeni HLA, anticorpi HLA con specificità nota vengono incubati con una sospensione di linfociti del paziente, in presenza del complemento.

In caso di legame dell'anticorpo all'antigene corrispondente ed in presenza del complemento, si verifica la lisi dei linfociti. Questa viene resa visibile per mezzo di una sostanza colorante (ad es. eosina). La valutazione dei linfociti lisati e di quelli vitali viene effettuata con un microscopio a contrasto di fase invertito.

Contenuto

Le Lymphotype HLA Biotest contengono antisieri anti-HLA policlonali umani e/o anticorpi monoclonali di specificità nota per la determinazione degli antigeni HLA di classe I o di classe II. Gli anticorpi monoclonali possono essere di provenienza umana o murina.

Ogni pozzetto contiene 1 µl di reagenti anti-HLA e 6-8 µl di olio minerale. Ogni Lymphotype HLA-ABC contiene un controllo positivo ed un controllo negativo. Ogni Lymphotype HLA-DR/DQ contiene, inoltre, un controllo anti-linfociti B ed un controllo anti-linfociti T. La disposizione dei singoli reagenti anti-HLA è riportata nei fogli di lavoro allegati. Per un miglior controllo macroscopico, i reagenti anti-HLA sono colorati con rosso fenolo e conservati con sodio azide (0,095%).

Precauzioni

Il test deve essere effettuato da tecnici di laboratori autorizzati e ben preparati. Tutti i materiali di origine umana impiegati per questo prodotto sono stati testati, per accertare l'eventuale presenza di:

HBsAg, anti-HCV e anti-HIV-1/2 dando esito negativo.

Tuttavia, tutti i prodotti di origine umana devono essere considerati potenzialmente in grado di trasmettere epatiti, HIV o altre malattie infettive. Si raccomanda di attenersi alle disposizioni di sicurezza.

Tutte le micropiastrine utilizzate dovrebbero essere considerate come materiale potenzialmente infetto e distrutte in accordo alle linee guida nazionali.

Conservazione

Le **[MP]** e l'annesso **[COMP]** liofilo sono stabili fino alla data dichiarata sulle rispettive etichette.

Le Lymphotype HLA devono essere conservate ad almeno -20°C. Le confezioni consegnate in ghiaccio secco devono essere **immediatamente** trasferite nel luogo di conservazione a -20°C. Le confezioni di Lymphotype HLA dopo essere state aperte non possono essere conservate insieme a ghiaccio secco.

Dopo lo scongelamento, le **[MP]** dovrebbero essere utilizzate entro 60 minuti. **Non ricongelare le piastrine!**

Segnali di deterioramento

Dopo lo scongelamento la colorazione gialla degli antisieri può indicare una variazione del pH. Tali **[MP]** **non** dovrebbero essere utilizzate.

Raccolta dei campioni e preparazione dei linfociti

Isolamento dei linfociti (centrifugazione con gradiente di densità)

- Miscelare circa 5 ml (10-20 ml per una tipizzazione HLA-DR/DQ) di sangue fresco in eparina (circa 10 unità di eparina per ogni ml di sangue) con uguale volume di soluzione di Hanks. Il campione di sangue può essere conservato a temperatura ambiente (20...24°C) per un massimo di 24 ore.
- Porre in una provetta da centrifuga una parte di Lymphoflot (20...24°C) e stratificare sopra un uguale volume di sangue diluito del campione: Evitare di mescolare i due strati
- Centrifugare per 20 minuti a 1000 x g senza freno. Recuperare i linfociti, che appaiono come un anello bianco tra il plasma ed il Lymphoflot, in una provetta da centrifuga. Riempire con soluzione di Hanks e mescolare.
- Centrifugare per 10 minuti a 230 x g. Decantare il supernatante, risospendere il sedimento, riempire con soluzione di Hanks e mescolare.
- Centrifugare nuovamente per 10 minuti a 110 x g, e decantare il supernatante.
- Per una tipizzazione HLA-ABC risospendere il sedimento di linfociti in Lymphostabil. La sospensione di linfociti dovrebbe contenere ca. 2000-3000 linfociti/µl.

Nota: i linfociti possono essere isolati anche mediante l'impiego di biglie immunomagnetiche. La descrizione della preparazione dei linfociti e delle modifiche riguardanti i tempi di incubazione è contenuta nel foglio illustrativo allegato alle Beads.

Per l'esecuzione di una tipizzazione HLA-ABC vedere più avanti il punto "Test di microlinfocitotossicità". Per l'esecuzione di una tipizzazione HLA-DR/DQ vedere più avanti il punto "Separazione in linfociti T e B".

Separazione in linfociti T e B

- Riempire con circa 0,15 g di ovatta di nylon (= batuffolo di ovatta) una siringa monouso da 2 ml o simile. Lavare il batuffolo di ovatta con circa 20 ml di soluzione di Hanks e circa 10 ml di terreno riscaldato a 37°C (terreno = FCS al 10% v/v in Lymphostabil).
- Tappare le due estremità della siringa con parafilm ed incubare per 30 minuti a 37°C in termostato o a bagnomaria. I batuffoli di ovatta così preparati possono essere conservati, fino al momento dell'uso, ad una temperatura di almeno -20°C. Dopo lo scongelamento ed il lavaggio con il terreno riscaldato a 37°C i batuffoli di ovatta sono nuovamente pronti per l'uso.
- Risospingere il sedimento di linfociti, come descritto al punto 5, in 1 ml di terreno riscaldato a 37°C e metterlo sul batuffolo di ovatta. Chiudere la siringa con parafilm ed incubare per 30 minuti a 37°C.
- Inserire l'ago nella siringa in modo da ridurre la velocità del flusso.
- Eluire i linfociti T non adesi con 10-20 ml di soluzione di Hanks riscaldata a 37°C e raccogliarli in una provetta da centrifuga provvista di etichetta.
- Dopo aver rimosso l'ago, eluire in un'altra provetta da centrifuga i linfociti B con circa 2 ml di terreno riscaldato a 37°C. Aiutandosi con una pinzetta, pressare con cautela l'ovatta e sprimacciarla. Ripetere 4-5 volte questo passaggio.
- Centrifugare i linfociti T e B per 10 minuti a 230 x g. Decantare il supernatante.
- Risospingere i linfociti T e B con Lymphostabil e portarli ad una concentrazione di 2000-3000/µl.

Usare la provetta con i linfociti T per la tipizzazione HLA-ABC e la provetta con i linfociti B per la tipizzazione HLA-DR/DQ.

Metodica

Materiale fornito

- 1 confezione Lymphotype HLA è costituita da 6 **[MP]** e 2 flaconcini di **[COMP]**.
 - Lymphotype HLA-ABC 72 (6 **[MP]** con 72 reagenti anti-HLA per 6 tipizzazioni ABC)
 - Lymphotype HLA-AB 72 (6 **[MP]** con 72 reagenti anti-HLA per 6 tipizzazioni AB)
 - Lymphotype HLA-ABC 120 o 144 (3 x 2 **[MP]** con 120 o 144 reagenti anti-HLA per 3 tipizzazioni ABC)
 - Lymphotype HLA-AB 120 o 144 (3 x 2 **[MP]** con 120 o 144 reagenti anti-HLA per 3 tipizzazioni AB)
 - Lymphotype HLA-B27 common (6 **[MP]** per 30 determinazioni B27)
 - Lymphotype HLA-B27 special (6 **[MP]** per 18 determinazioni B27)
 - Lymphotype HLA-B5 (6 **[MP]** per 36 determinazioni B5)
 - Lymphotype HLA-DR/DQ 60 o 72 (6 **[MP]** con 60 o 72 reagenti anti-HLA per 6 tipizzazioni DR/DQ)
- 2x2 ml di **[COMP]** liofilizzato (coniglio), non tossico per i linfociti umani
- Fogli di lavoro (allegato)
- 1 schema di interpretazione (allegato)

Ulteriori materiali necessari

- * Soluzione di Hanks (priva di Ca++ e Mg++)
- * Lymphoflot (gradiente di densità per l'isolamento dei linfociti, densità 1,077 g/ml)
- * Lymphostabil (terreno di McCoy 5A, modificato sec. Park e Terasaki, privo di Ca++ e Mg++, per la conservazione dei linfociti)
- * Siero di vitello fetale (FCS) inattivato al calore (Sigma)

* Disponibile presso Biotest

- Ovatta di nylon
- Eosina Y (sciogliere al 5% in acqua distillata e filtrare) (Merck)
- Formaldeide per istologia al 37%, priva di acidi (filtrare e portare a pH 7,2 ± 0,2 con idrossido di sodio 0,1 N) (Merck)
- Siringhe monouso da 2 ml o similari
- Olio minerale
- Vetrino coprioggetto, 50 x 75 mm
- Microsiringhe (Hamilton) 0,050 ml siringa
- Dispenser (Hamilton N. PB-600-1)
- Microsiringa Terasaki (Hamilton) 6 x 0,250 ml siringhe
- Microdispenser per micropiastre (Greiner)
- Microscopio a contrasto di fase invertito

Test di microlinfocitotossicità

- Subito prima dell'uso portare le [MP] a temperatura ambiente. Non lasciare a temperatura ambiente per più di 60 minuti.
NON CONGELARE NUOVAMENTE!
- Pipettare in ogni pozzetto 1 µl della sospensione linfocitaria (reazione antigene-anticorpo) ed incubare a temperatura ambiente (20...24°C):
30 minuti per la tipizzazione HLA-ABC
60 minuti per la tipizzazione HLA-DR/DQ
- 15 minuti prima del termine del tempo di incubazione, ricostituire il [COMP] accluso con il volume di acqua distillata indicato sull'etichetta, agitando leggermente. **NON CONGELARE NUOVAMENTE! ELIMINARE IL COMPLEMENTO RESIDUO!**
- Aggiungere in ogni pozzetto 5-6 µl di [COMP] (lisi dei linfociti) ed incubare a temperatura ambiente (20...24°C):
60 minuti per la tipizzazione HLA-ABC,
120 minuti per la tipizzazione HLA-DR/DQ
- Mettere in ogni pozzetto 3-4 µl di eosina e lasciar colorare le cellule per ca. 3 minuti.
- Fermare le reazioni con 6-7 µl di formaldeide per ogni pozzetto.
- Se necessario, aggiungere dell'altro olio nei pozzetti
- Coprire con un vetrino copripiastre il [MP] ultimato e leggere non prima di 30 minuti. La valutazione è ancora possibile per un massimo di 3 giorni, se le piastre vengono conservate a 2...8°C. Poiché i linfociti lisati sedimentano più lentamente dei linfociti vitali, si raccomanda di rileggere le [MP] dopo 12-24 ore. Leggere la piastra secondo lo schema a serpentina corrispondente al foglio lavoro: da 1A a 1F; da 2F a 2A; da 3A a 3F; ecc.

Controllo di qualità

Controllo negativo: Con il controllo negativo si verifica la vitalità delle sospensioni linfocitarie impiegate. Il controllo negativo deve essere negativo; se è debolmente positivo, si deve tenerne conto nella valutazione.

Controllo positivo: Il controllo positivo verifica l'attività del complemento. Il controllo positivo deve dare almeno l'81-100% di linfociti lisati.

Controllo dei linfociti anti-B (Lymphotype HLA-DR/DQ): Il Controllo dei linfociti anti-B è nella posizione 1C. Il controllo viene impiegato per determinare la purezza delle sospensioni di linfociti B.

Controllo dei linfociti anti-T (Lymphotype HLA-DR/DQ): Il Controllo dei linfociti anti-T è nella posizione 1D. Con questo controllo si verifica la separazione in linfociti T e B dei linfociti isolati.

Il controllo dei linfociti anti-B deve dare l'81-100% di linfociti lisati ed il controllo dei linfociti anti-T deve dare meno del 20% di cellule lisate. Se non si ottengono questi valori, ciò significa che la separazione dei linfociti T e B è stata incompleta, e si deve ripetere il test.

Valutazione delle reazioni

La lettura viene eseguita con un microscopio a contrasto di fase invertito. I linfociti vitali sono chiari e luminosi (= reazione negativa), i linfociti lisati sono scuri e più grandi (= reazione positiva). La percentuale dei linfociti lisati rispetto alla conta totale dei linfociti viene espressa mediante score.

% cellule lisate		Valutazione
0 - 10 %	=	Score 1 negativo
11 - 20 %	=	Score 2 negativo dubbio
21 - 50 %	=	Score 4 debolmente positivo
51 - 80 %	=	Score 6 positivo
81 - 100 %	=	Score 8 fortemente positivo
	=	Score 0 non leggibile

Riportando i risultati sui fogli di lettura, si possono identificare gli antigeni presenti sulla sospensione di linfociti. Le reazioni positive intervengono quando l'antigene incontra l'anticorpo corrispondente, presente nell'antisiero.

Possibilità di errori

Cause di reazioni più deboli o falsamente negative:

- La contaminazione di eritrociti può rendere difficile la lettura al microscopio (falsi negativi).
- La contaminazione di piastrelle può sottrarre anticorpo o complemento.
- Numero di linfociti troppo elevato. La concentrazione delle cellule è determinante poiché il test è stato standardizzato utilizzando una determinata ratio antigene-anticorpo.
- La colorazione in giallo del siero indica una contaminazione batterica o una variazione del pH (ghiaccio secco!).
- Confezioni aperte o singole piastre conservate insieme a ghiaccio secco.
- [MP] scongelate e poi nuovamente congelate.
- [COMP] ricostituito conservato a temperatura ambiente (20...24°C) troppo tempo prima dell'uso.
- [COMP] ricostituito scongelato e nuovamente usato.
- Riduzione dei tempi di incubazione.
- Temperatura di incubazione troppo bassa. Il test di microlinfocitotossicità è un test temperatura-dipendente.

Cause di reazioni falsamente positive:

- A causa di una struttura molecolare simile, gli antigeni possono reagire con reagenti anti-HLA di specificità diversa (reazione crociata).
- Temperatura di incubazione troppo elevata.
- Tempi di incubazione troppo lunghi.
- Linfociti previamente danneggiati (positività del controllo negativo).
- Errore nell'aggiunta del fissativo.

Valori attesi

Le frequenze fenotipiche degli antigeni HLA classe I e classe II possono variare a seconda (8).

Specifiche caratteristiche

Specificità e forza di reazione dei reagenti HLA

Tutti i reagenti anti-HLA selezionati per le Lymphotype HLA Biotest possiedono una specificità definita. Essi sono stati testati, per quanto riguarda specificità e forza di reazione, contro diversi panel di linfociti tipizzati per HLA freschi o congelati.

I reagenti anti-HLA selezionati hanno reagito positivamente con i linfociti che avevano dimostrato la presenza dell'antigene (score 4-8).

I reagenti anti-HLA selezionati hanno reagito negativamente (score 1-2) con i linfociti che non avevano dimostrato l'antigene.

Ogni lotto di Lymphotype è testato con un adeguato numero di sospensioni linfocitarie ben definite. La percentuale delle reazioni false positive e rispettivamente false negative non può superare il 10%. Le tipizzazioni eseguite con Lymphotype HLA hanno dato risultati chiari.

Il **controllo negativo** è costituito da siero di un donatore sano di sesso maschile, gruppo sanguigno AB, e non ha mostrato alcuna reazione citotossica nel test di linfocitotossicità con i linfociti dei donatori selezionati.

Il **controllo positivo** è un siero di coniglio anti-linfocita che reagisce citotossicamente con tutti i linfociti umani.

Il **controllo dei linfociti anti-B** è un anticorpo monoclonale (clone Tü35, isotipo IgG2a), che reagisce in modo citotossico con i linfociti B. Esso non reagisce con i linfociti T, i granulociti, le piastrine, i monociti e gli eritrociti.

Il **controllo dei linfociti anti-T** è un anticorpo monoclonale (clone 12F6, isotipo IgG2a), che reagisce in modo citotossico con i linfociti T. Esso è regolato contro l'antigene CD3, l'insieme dei linfociti T che si sviluppa esclusivamente su tutti i linfociti T e non sui linfociti B, i granulociti, i macrofagi e gli eritrociti.

Literatur

- Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am.J.Clin Pathol 69: 103-120, 1978
- Danilovs, J., Terasaki, P.I., Park, M.S., Ayoub, G.: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. In Histocompatibility Testing 1980. Terasaki P.I. Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 287-288, 1980
- Mueller-Eckhardt, G.: Serologischer Nachweis von HLA-Antigenen und HLA-Antikörpern. Infusionsther. Transfusionsmed. 21:192- 197, 1994
- DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
- Middleton, D., Bodmer, J., Heyes, J., Marsh, S.: HLA typing reagents: alloantiera and monoclonal antibodies, in: Histocompatibility Testing - A Practical Approach, eds. P.Dyer, D.Middleton, Oxford University Press, 1992
- Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H.A., Fauchet, R., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Sveigaard, A., Terasaki, P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 49: 297-321, 1997
- Tiwari, J.L., Terasaki, P.I.: HLA and Disease Associations, Springer Verlag 1985
- HLA 1991: Proceeding of the 11th International Workshop and Conference, Eds. Kimiyoshi Tsuji, Miki Aizawa, Takihiko Sasazuki, Oxford University Press, 1992
- Mittal, K.K.: Standardization of the HLA Typing Method and Reagents. Vox Sang. 34: 58-63, 1978

Lymphotype HLA

Para la determinación de los antígenos HLA humanos

Tamaño de kit

REF ⁽⁴⁾	823 020	HLA-ABC 72
REF ⁽⁴⁾	823 023	HLA-AB 72 AN
REF ⁽⁴⁾	823 028	HLA-AB 72 oriental
REF ⁽⁴⁾	823 030	HLA-ABC 120
REF ⁽⁴⁾	823 031	HLA-AB 120 special
REF ⁽⁴⁾	823 045	HLA-ABC 144 Italia
REF ⁽⁴⁾	823 070	HLA-AB 144
REF ⁽⁴⁾	823 100	HLA-DR/DQ 60
REF ⁽⁴⁾	823 102	HLA-DR/DQ 72
REF ⁽⁴⁾	823 110	HLA-B27 special
REF ⁽⁴⁾	823 111	HLA-B27 common
REF ⁽⁴⁾	823 115	HLA-B5

MP	Microplaca
COMP	Complemento
IVD	Sólo para el diagnóstico in vitro

Instrucciones de uso

Biotest Lymphotype HLA se utiliza para el diagnóstico in vitro de antígenos HLA humanos en la determinación de la microlinfocitotoxicidad dependiente del complemento (1,2,3,4,6,9). Biotest Lymphotype HLA es una placa de microtitulación lista para su uso con reactivos anti-HLA introducidos en los pocillos. Los reactivos anti-HLA pueden ser anticuerpos monoclonales anti-HLA o antisueros anti-HLA humanos policlonales (5). Lymphotype HLA-B27 se utiliza para la determinación del antígeno HLA-B27. Puesto que HLA-B27 se asocia estrechamente a nivel global a la espondilitis anquilosante, se utiliza para el diagnóstico de esta enfermedad (7). Lymphotype HLA-B5 se utiliza para la determinación del antígeno HLA-B5.

La disposición y especificidad de los reactivos anti-HLA se indican en las hojas de trabajo que se adjuntan a cada entrega. Los anticuerpos de especificidad idéntica pero número ID diferente proceden de donantes distintos y sirven para un mayor aseguramiento de los hallazgos.

Introducción

Los antígenos HLA son glicoproteínas de membranas. Se dividen en dos clases. Los antígenos de la clase I (HLA-ABC) se detectan en casi todas las células nucleadas. Los antígenos de la clase II (HLA-DR/DQ) sólo se encuentran en la superficie de unas pocas poblaciones celulares. Todos los linfocitos circulantes en sangre periférica son portadores de antígenos HLA-ABC. Los linfocitos B poseen además antígenos DR/DQ. Para la tipificación HLA-ABC, se puede utilizar una población de linfocitos totales o una población de linfocitos T. Para la tipificación DR/DQ, se debe efectuar un enriquecimiento de linfocitos B dado que estos representan sólo aproximadamente un 10-15% de la población total de linfocitos.

Principio de la prueba de microlinfocitotoxicidad

Para la determinación de los antígenos HLA, se incuban anticuerpos anti-HLA de especificidad conocida en presencia de complemento con una suspensión de linfocitos del sujeto.

Después de la adición de los linfocitos del sujeto a la placa Lymphotype HLA, se produce una lisis de los linfocitos en caso de presencia del anticuerpo correspondiente y en presencia de complemento. La lisis de los linfocitos se visualiza con un colorante (p.ej. eosina). La evaluación de los linfocitos lisados y los linfocitos vivos se realiza con un microscopio de contraste de fases inverso.

Contenido

Biotest Lymphotype contiene antisueros anti-HLA humanos policlonales o anticuerpos monoclonales de especificidad descrita para la determinación de antígenos HLA clase I o HLA clase II. Los anticuerpos monoclonales pueden ser de origen murino o humano. En cada pocillo, se encuentran 1 µl de reactivo anti-HLA y 6-8 µl de aceite de cubrición.

Todas las placas de HLA-ABC contienen además un control negativo y un control positivo. Todas las placas HLA-DR contienen además un control anti-linfocitos B y un control anti-linfocitos T. La disposición de los distintos reactivos anti-HLA está indicada en las hojas de trabajo adjuntas. Los reactivos HLA están teñidos con rojo de fenol y conservados con azida sódica (0,095%) para un mejor control macroscópico.

Medidas de precaución

El ensayo debe ser realizado por técnicos de laboratorio bien preparados y autorizados.

Todos los materiales de origen humano utilizados en este producto han sido comprobados en cuanto a la presencia de HB_sAG, anticuerpos anti-VHC y anti-VIH 1/2, no mostrando reactividad. Sin embargo, todos los productos de origen humano deberían ser considerados vectores de transmisión potenciales de la hepatitis, VIH u otros microorganismos infecciosos. Se recomienda tomar medidas de precaución adecuadas.

Conservación

Las **MP** y el **COMP** liofilizado suministrados son estables hasta la fecha indicada en sus etiquetas.

La Lymphotype HLA debe ser conservada a una temperatura de al menos -20°C. Los envases transportados en hielo seco se deben almacenar **inmediatamente** a -20°C. Los envases abiertos de Lymphotype HLA no se pueden almacenar junto con hielo seco.

MP descongelado deber ser usado para testar antes de transcurridos 60 minutos.

No refrigerar placas ya descongeladas!

Todas las microplacas MP deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y deben ser destruidas siguiendo los protocolos nacionales establecidos .

Indicaciones de deterioración

Una coloración amarillenta de los reactivos de anti-HLA que permanece después de la descongelación puede indicar un cambio del valor del pH. Estos **MP** no deben ser usados para el ensayo.

Colección del espécimen y preparación de linfocitos

Aislamiento de los linfocitos (centrifugación en gradiente diferencial)

- Se mezclan aprox. 5 ml (10-20 ml para una tipificación HLA-DR/DQ) de una muestra de sangre fresca heparinizada (aprox. 10 unidades de heparina por ml de sangre) con el mismo volumen de solución de Hanks y se mezcla. La muestra de sangre se puede conservar a temperatura ambiente (20...24°C) durante un período de hasta 24 horas.
- Se introduce Lymphoflot (20...24°C) en un tubo de centrifugación y se cubre con el mismo volumen de la muestra de sangre diluida de modo que no se mezclen la sangre y Lymphoflot.
- Se centrifuga a 1000 x g sin freno durante 20 minutos. Los linfocitos se depositan en forma de anillo blanco en el límite entre el plasma y Lymphoflot. El anillo celular se pipetea cuidadosamente en un tubo de centrifugación nuevo, se rellena con solución de Hanks y se mezcla.
- Se centrifuga a 230 x g durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el sedimento, se rellena con solución de Hanks y se mezcla.
- Se centrifuga nuevamente a 110 x g durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante.
- Para la tipificación HLA-ABC, se resuspende el sedimento linfocitario en Lymphostabil. La suspensión de linfocitos debe contener 2000 - 3000 linfocitos/µl.

Nota: Los linfocitos se pueden aislar también con perlas inmunomagnéticas. En el prospecto de los Beads, se describe el procedimiento de preparación de los linfocitos y se indican los tiempos de incubación modificados.

Para continuar la tipificación HLA-ABC, véase el punto "Microtest de linfocitotoxicidad".

Para continuar la tipificación HLA-DR/DQ, véase el punto "Separación de linfocitos T y linfocitos B".

Separación de linfocitos T y linfocitos B

- Se rellena, sin compactar, una jeringa de un solo uso de 2 ml o similar con aprox. 0.15 g de algodón de nylon (= columna de algodón). Se lava la columna de algodón con aprox. 20 ml de solución de Hanks y aprox. 10 ml de medio (medio = FCS al 10% (V/V) en Lymphostabil), calentadas respectivamente a 37°C.
- Se cierran ambos extremos de la columna de algodón con Parafilm y se incuba en la estufa de cultivo o al baño maría a 37°C durante 30 minutos. Sometidas a esta preparación previa, las columnas de algodón se pueden almacenar a una temperatura de al menos -20°C hasta el momento del uso. Las columnas de algodón están nuevamente listas para el uso después de descongelar y lavar con medio calentado a 37°C.
- Se resuspende el sedimento linfocitario obtenido en el punto 5 en 1 ml de medio calentado a 37°C y se introduce en la columna de algodón. Se cierra la columna de algodón con Parafilm y se incuba a 37°C durante 30 minutos.
- Se monta la cánula en la columna de algodón para reducir la velocidad de flujo.
- Se eliminan los linfocitos T no adheridos con 10-20 ml de solución de Hanks calentada a 37°C y se recogen en un tubo de centrifugación rotulado.
- Después de retirar la cánula, se diluyen los linfocitos B con aprox. 2 ml de medio calentado a 37°C en un tubo de centrifugación nuevo. Con una pinza, se comprime y descomprime cuidadosamente el algodón. Se repite el proceso 4-5 veces.
- Se centrifugan los linfocitos T y B a 230 x g durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante.
- Se resuspenden los linfocitos T y B con HLA-ABC y se ajustan a un recuento celular de 2000 -3000 linfocitos/µl.

Se utilizan el tubo con los linfocitos T para la tipificación HLA-ABC y el tubo con los linfocitos B para la tipificación HLA-DR/DQ.

Método (NIH)

Material proporcionado

- Un paquete de Lymphotype HLA contiene 6 **MP** y 2 frascos de **COMP**.
 - Lymphotype HLA-ABC 72 (6 **MP** con 72 reactivos anti-HLA para 6 tipificaciones ABC)
 - Lymphotype HLA-AB 72 (6 **MP** con 72 reactivos anti-HLA para 6 tipificaciones AB)
 - Lymphotype HLA-ABC 120 ó 144 (3 x 2 **MP** con 120 ó 144 reactivos anti-HLA para 3 tipificaciones ABC)
 - Lymphotype HLA-AB 120 ó 144 (3 x 2 **MP** con 120 ó 144 reactivos anti-HLA para 3 tipificaciones AB)
 - Lymphotype HLA-B27 common (6 **MP** para 30 determinaciones de B27)
 - Lymphotype HLA-B27 special (6 **MP** para 18 determinaciones de B27)
 - Lymphotype HLA-B5 (6 **MP** para 36 determinaciones de B5)
 - Lymphotype HLA-DR/DQ 60 ó 72 (6 **MP** con 60 ó 72 reactivos anti-HLA para 6 tipificaciones DR/DQ)
- 2 x 2 ml de **COMP**, liofilizado, non-citotóxico para los linfocitos humanos (conejo)
- Hojas de trabajo (adjunto)
- 1 esquema de la reacción de la interpretación (adjunto)

Otros materiales necesarios

- 1.* Solución de Hanks (libre de Ca^{++} y Mg^{++})
- 2.* Lymphoflot (gradiente de densidad para el aislamiento de linfocitos, densidad 1,077 g/ml)
- 3.* Lymphostabil (Medio de McCoy 5A, modificado según Park y Terasaki, libre de Ca^{++} y Mg^{++} para el almacenamiento de linfocitos)
4. Suero fetal de ternera (FCS) sometido a inactivación térmica, p.ej. Sigma.
5. Algodón de nylon
6. Eosina Y (disolver al 5% en agua destilada y filtrar) p.ej. Merck.
7. Formaldehído para el examen histológico, al 37%, sin ácido (filtrar y ajustar a pH $7,2 \pm 0,2$ con sosa cáustica 0,1 N) p.ej. Merck
8. Jeringa de un solo uso de 2 ml o similar
- 9.* Aceite de cubrición
- 10.* Cubreobjetos, 50 x 75 mm
11. Jeringas de microlitros p.ej. Hamilton, 0,050 ml jeringa
12. Dispositivo de dosificación, p.ej. Hamilton N° PB-600-1
13. Dispensador Terasaki p.ej. Hamilton, 6 x 0,250 ml jeringas
14. Microdispensador para placas de microtitulación, p.ej. Greiner
15. Microscopio de contraste de fases inverso

Microtest de linfocitotoxicidad

1. Se descongela [MP] a temperatura ambiente antes del uso. No se debe mantener a temperatura durante más de 60 minutos. ¡NO VOLVER A CONGELAR!
2. Se pipetea 1 µl de suspensión linfocitaria ajustada en cada pocillo (reacción antígeno-anticuerpo). Se incuba a temperatura ambiente (20...24°C) para la tipificación HLA-ABC durante 30 minutos y para la tipificación HLA-DR/DQ durante 60 minutos
3. Quince minutos antes de finalizar el tiempo de incubación, se reconstituye el [COMP] adjunto con el volumen de agua destilada indicada en la etiqueta agitando suavemente. ¡NO VOLVER A CONGELAR! ¡DESECHAR LOS RESTOS DE COMPLEMENTO!
4. Se añaden 5-6 µl de [COMP] por pocillo (lisis de los linfocitos). Se incuba a temperatura ambiente (20...24°C) para la tipificación HLA-ABC durante 60 minutos y para la tipificación HLA-DR/DQ durante 120 minutos
5. Se tiñen las células durante aprox. 3 minutos añadiendo 3-4 µl de eosina a cada pocillo.
6. Las reacciones se fijan añadiendo 6-7 µl de formaldehído a cada pocillo.
7. Si procede, se pueden lubricar además las [MP].
8. Se cubre el [MP] acabado con un cubreobjetos y se leen los resultados al menos 30 minutos después de finalizar la prueba. Si se conserva a 2...8°C, la prueba se puede valorar durante un período de hasta 3 días. Ya que los linfocitos lisados sedimentan más lentamente que los linfocitos vitales se recomienda no volver a leer la Lymphotype HLA después de 12-24 horas. Leer la placa siguiendo el sentido que corresponde al protocolo de trabajo: 1A hacia 1F; 2F hacia 2A; 3A hacia 3F; etc.

Control de calidad

Control negativo: El control negativo permite controlar la vitalidad de las suspensiones linfocitarias utilizadas. El control negativo debería ser negativo. Si es débilmente positivo, se tendrá en cuenta en la valoración.

Control positivo: El control positivo comprueba la actividad del complemento. El control positivo debería indicar al menos un 81-100% de linfocitos lisados.

Control antilinfocitos B (Lymphotype HLA-DR/DQ): El control se utiliza para determinar la pureza de la suspensión de linfocitos B. El control antilinfocitos B está en la posición 1C.

Control antilinfocitos T (Lymphotype HLA-DR/DQ)

Con este control se comprueba la separación de los linfocitos aislados en linfocitos T y linfocitos B. El control antilinfocitos T está en la posición 1D.

En el control antilinfocitos B, deberían aparecer un 81-100% de linfocitos lisados y en el control antilinfocitos T, un recuento inferior al 20% de células lisadas. Si no se alcanzan estos valores, la separación de los linfocitos B y los linfocitos T fue incompleta. Se deberá repetir la prueba.

Valoración de las reacciones

La lectura se efectúa con un microscopio de contraste de fases inverso. Los linfocitos vivos son claros y brillantes (=reacción negativa), los linfocitos lisados son de color oscuro y mayor tamaño (=reacción positiva). El porcentaje de linfocitos lisados respecto al recuento total de linfocitos se expresa como puntuación.

% de células lisadas		Valoración	
0	- 10 %	=	Score 1 negativa
11	- 20 %	=	Score 2 negativa dudosa
21	- 50 %	=	Score 4 débilmente positiva
51	- 80 %	=	Score 6 positiva
81	- 100 %	=	Score 8 muy positiva
		=	Score 0 no legible

Después de leer los resultados, identifique los antígenos presentes en la preparación de linfocitos que se ha analizado. Las reacciones son positivas cuando los antígenos coresponden a los anticuerpos presentes en el antisuero.

Posibilidades de error

Causa de reacciones negativas falsas o reacciones débiles:

- La contaminación de eritrocitos puede hacer difícil la evaluación microscópica por la confusión visual con los linfocitos negativos.
- La contaminación de plaquetas puede reducir el anticuerpo y complemento.
- Recuento excesivo de linfocitos. La concentración celular es importante ya que el ensayo está estandarizado usando cierta relación antígeno-anticuerpo.
- la coloración amarilla de los sueros es un indicio de contaminación bacteriana o cambio de pH (hielo seco).
- Se han almacenado paquetes abiertos o placas individuales junto con hielo seco.
- Se han descongelado y vuelto a congelar [MP].
- Almacenamiento excesivo a temperatura ambiente (20...24°C) del [COMP] disuelto antes del uso.
- Se han congelado y se han vuelto a utilizar restos del [COMP] disuelto.
- Acortamiento de los tiempos de incubación
- Temperatura de incubación excesivamente baja. El ensayo de microlinfocitotoxicidad depende de la temperatura.

Causa de reacciones positivas falsas:

- Los antígenos pueden reaccionar con reactivos anti-HLA de especificidad distinta (reactividad cruzada), debido a estructuras moleculares parecidas.
- Temperatura de incubación demasiado elevada.
- Tiempos de incubación demasiado largos.
- Linfocitos alterados previamente (control negativo positivo).
- Fallo en la adición del fijador.

Valores Esperados

Las frecuencias fenotípicas para HLA Clase I y Clase II varían en diferentes poblaciones (8).

Específicas características de funcionamiento

Especificidad e intensidades de reacción de los reactivos anti-HLA

Todos los reactivos HLA seleccionados para el Lymphotype HLA poseen una especificidad definida. Se ensayó la especificidad e intensidad de reacción de estos reactivos en varios paneles de linfocitos tipificados recién aislados o congelados.

Los reactivos HLA seleccionados reaccionaron positivamente (puntuación 4-8) con los linfocitos portadores demostrados del antígeno.

Los reactivos HLA seleccionados reaccionaron negativamente (puntuación 1-2) con los linfocitos no portadores demostrados del antígeno.

Para cada lote de Lymphotype HLA se realiza una cantidad suficiente de tests con suspensiones de linfocitos.

El porcentaje de reacciones falsas positivas o reacciones falsas negativas no debe superar el 10%. Las tipificaciones realizadas con Lymphotype HLA proporcionaron resultados inequívocos.

El **control negativo** consiste en un suero de un donante masculino sano con el grupo sanguíneo AB y no muestra reacciones citotóxicas en el test de linfocitotoxicidad con linfocitos de donante no seleccionados.

El **control positivo** es un suero antilinfocito de conejo el cual reacciona citotóxicamente con todos los linfocitos humanos.

El **control antilinfocitos B** es un anticuerpo monoclonal (clon Tü35, isotipo IgG2a) que muestra una reacción citotóxica con los linfocitos B. No reacciona con los linfocitos T, granulocitos, plaquetas, monocitos y eritrocitos.

El **control antilinfocitos T** es un anticuerpo monoclonal (clon 12 F6, isotipo IgG2a) que muestra una reacción citotóxica con los linfocitos T. Va dirigido contra el antígeno celular T CD3 que se expresa exclusivamente en todos los linfocitos T y no se expresa en los linfocitos B, granulocitos, macrófagos y eritrocitos.

Literatur

1. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am.J.Clin Pathol 69: 103-120, 1978
2. Danilovs, J., Terasaki, P.I., Park, M.S., Ayoub, G.: B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool. In Histocompatibility Testing 1980. Terasaki P.I. Ed., UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 287-288, 1980
3. Mueller-Eckhardt, G.: Serologischer Nachweis von HLA-Antigenen und HLA-Antikörpern. Infusionsther. Transfusionsmed. 21:192- 197, 1994
4. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.
5. Middleton, D., Bodmer, J., Heyes, J., Marsh, S.: HLA typing reagents: alloantigen and monoclonal antibodies, in: Histocompatibility Testing - A Practical Approach, eds. P.Dyer, D.Middleton, Oxford University Press, 1992
6. Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H.A., Fauchet, R., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Terasaki, P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Tissue Antigens 49: 297-321, 1997
7. Tiwari, J.L., Terasaki, P.I.: HLA and Disease Associations, Springer Verlag 1985
8. HLA 1991: Proceeding of the 11th International Workshop and Conference, Eds. Kimiyoshi Tsuji, Miki Aizawa, Takihiko Sasazuki, Oxford University Press, 1992
9. Mittal, K.K.: Standardization of the HLA Typing Method and Reagents. Vox Sang. 34: 58-63, 1978

* Proveedor Biotest