

HLA Typing Tray
Plaque de typage des antigènes HLA DE CLASSE I
(72, 72BL, 72L, 72OR, 72AB1/72AB2, 72C
72ABC1/72ABC2, 96, 96C)

INTRODUCTION

Les plaques de typage sont utilisées pour déterminer la présence ou l'absence d'antigènes HLA de classe I à la surface des lymphocytes en technique de microlymphocytotoxicité complément-dépendante.

Usage *in vitro*

COMPOSITION DU COFFRET (SOMMAIRE)

Tous les puits contiennent des antisérums d'origine humaine excepté le puits 1A qui contient des anticorps de lapin anti-lymphocyte humain et est utilisé comme contrôle positif (ce puits doit toujours être positif pour valider l'analyse). Le puits 1B contient un contrôle négatif provenant d'un pool de sérum d'hommes sains de groupe AB et non transfusés. Ce puits ne donnent aucune réactivité cytotoxique avec 72 lymphocytes de donneurs pris au hasard. Tous les antisérums sont identifiés par des tests sérologiques utilisant des panels de cellules fraîches.

Les différents styles de plaques disponibles fournissent plusieurs choix pour des tests abrégés ou étendus. Les plaques de typage de 72 puits contiennent les antisérums pour tester les loci A,B; A,B,C ou bien pour les loci associés aux ethnies, présents dans les plaques de typage pour les orientaux (72OR) ou les noirs (72 BL). Les plaques de typage de 96 puits contiennent une gamme plus étendue d'antisérums pour tester pour les loci A,B ou A,B,C. La plaque 72C contient des antisérums pour tester de Cw1 à Cw4 et la plaque 72ABC2 fournit les antisérums pour tester de Cw1 à Cw8.

La caractérisation des antigènes HLA peut être utilisée pour l'évaluation des patients et/ou des donneurs pour la transplantation d'organe, la transfusion de plaquettes, la transplantation de la moëlle osseuse et les études d'association avec les maladies.

PRINCIPE DU TEST

Les lymphocytes viables à tester sont incubés en présence d'antisérums spécifiques et de complément de lapin. Si les antigènes présents à la surface de la cellule correspondent aux anticorps présents dans l'antisérum, il y aura une lyse cellulaire. La mort des cellules sera observée sous microscope à contraste de phase après ajout d'éosine (colorant). La capacité de détection des antigènes de chaque antisérum est précisée sur le tableau d'analyse inclus dans chaque lot de réactif.

COMPOSITION DU COFFRET

- Plaques de typage de 72 ou 96 puits.
- Complément de lapin: non toxique pour les lymphocytes normaux.
 - COMP02: 0,5 ml
 - COMP03: 0,75 ml
 - COMP07: 5,0 ml
- Huile minérale: Les antisérums de la plaque sont recouverts d'une huile minérale afin de prévenir l'évaporation.

CONSERVATION ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ne pas diluer de réactifs. Aucune composante du coffret n'a besoin d'être dilué.
- Les plaques et le complément se conservent à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Ne pas utiliser de réactifs ayant passé la date de péremption.
- Décongeler les plaques et le complément à température ambiante pendant 15 minutes et les utiliser dans les 30 minutes suivant le début de la décongélation. Ne pas recongeler.
- Ne pas conserver les plaques dans de la glace sèche une fois le sac hermétique ouvert.

PRECAUTIONS

- Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des plaques a été testé et trouvé négatif concernant les anticorps anti-VIH 1+2, l'hépatite C et l'antigène HBs, mais doit cependant être manipulé comme un produit potentiellement infectieux.
- Certains antisérums présents dans les plaques contiennent 0,1 % d'acide de sodium. **PRECAUTIONS: L'acide de sodium réagit avec le plomb et le cuivre de la plomberie pour former des métaux acides hautement explosifs. Lorsqu'il a coulé**

dans l'évier, il est recommandé de rincer avec beaucoup d'eau pour éviter la concentration d'acide. L'acide de sodium est un poison toxique si ingéré.

- Disposer de toutes les composantes de la trousse selon les règlements locaux.

ECHANTILLONS

Les échantillons de **sang périphérique** prélevés dans de l'héparinate de sodium ou de l'ACD ou bien des cellules ayant été cryopréservées selon une technique acceptable peuvent être utilisés pour ce test.

Prélèvement à l'héparinate de sodium: Prélever 10 ml de sang dans USP 143 unités d'héparinate. Le sang hépariné doit être gardé à température ambiante avant tout isolement des lymphocytes qui doit être effectué rapidement (dans les 24 à 48 heures suivant le prélèvement).

Prélèvement à l'ACD: Le sang ACD doit être gardé à température ambiante avant tout isolement des lymphocytes qui doit être effectué rapidement (dans les 24 à 48 heures suivant le prélèvement).

- Les échantillons doivent être prélevés avant la thérapie myoablative du patient.
- Prélever les échantillons avant une transfusion sanguine ou au moins 48 heures après une transfusion sanguine.
- Une contamination excessive par des plaquettes peut masquer la réaction lymphocytaire ou causer de fausses réactions négatives.

Les tissus de don d'organes tels que **ganglions lymphatiques ou rate** peuvent également être utilisés. Préparer le tissu et performer le test le plus rapidement possible suite au prélèvement du tissu.

MODE OPERATOIRE

La procédure décrite est le protocole recommandé. L'utilisateur peut établir des variations de la procédure (i.e. fluorescence, temps d'incubation, concentration cellulaire); cependant, l'utilisateur est responsable pour déterminer que ces protocoles sont acceptables avec les plaques de typage des antigènes HLA de GTI.

Matériel nécessaire fourni:

- Plaque de typage des antigènes HLA (HLA Typing Tray)
- Tableaux de résultats (À copier si nécessaire)
- Tableau d'analyse des antisérums
- Microtubes de complément de lapin (ABC Complement)

Matériel nécessaire non fourni:

- Sérum de veau foetal à 5%. Dans un milieu de culture de lymphocytes.
- Seringue de 0,05 ml permettant de distribuer en répétition un volume de 1 µl.
- Seringue de 0,25 ml permettant de distribuer en répétition un volume de 5 µl.
- Seringue de 1 ml avec 6 embouts permettant de distribuer en répétition un volume de 3,3 µl.
- Lamelle (75 x 50 mm).
- Eosine Y: 5 g pour 100 ml d'HBSS. Filtrer à travers du papier Whatman 1.
- Formaldéhyde: ajouter 2 ml de rouge de phénol à 0,5 % à 500 ml de formaldéhyde (10 %). Ajuster à pH 7,2 avec de l'acide chlorhydrique concentré.
- Microscope à contraste de phase.

Procédure:

1. Préparer les cellules selon les procédures pour les tests de lymphocytotoxicité établis dans le laboratoire utilisateur.
2. Déterminer si la viabilité cellulaire est acceptable pour le test. La viabilité des lymphocytes doit être au moins de 85%.
3. Ajuster la concentration de cellules à 2×10^6 /ml avec le de sérum foetal à 5%.
4. Sortir la plaque du congélateur et la laisser au moins 15 minutes à la température ambiante; l'utiliser dans les 30 minutes suivant le début de la décongélation.
5. A l'aide de la seringue de 0,05 ml, déposer avec précaution 1 µl d'une suspension de 2×10^6 lymphocytes par ml juste en dessous de l'huile. Assurez-vous que les cellules et les antisérums soient bien mélangés.
6. Incuber la plaque 30 minutes à 20-25°C.
7. A l'aide de la seringue de 0,25 ml, ajouter 5 µl de complément de lapin dans chaque puits.
8. Incuber la plaque 1 heure à 20-25°C.
9. A l'aide de la seringue de 1 ml, ajouter 3,3 µl d'éosine 5 % dans chaque puits.
10. Incuber la plaque 5 minutes à 20-25°C.
11. Ajouter 6,6 µl de solution tamponnée de formaldéhyde dans chaque puits pour arrêter la réaction.
12. Laisser les cellules sédimenter pendant 5-10 minutes avant de couvrir les puits avec une lamelle de 75 x 50 mm.

13. S'ils ne sont pas lus immédiatement, ranger les plaques dans le réfrigérateur avant de les lire pour réduire la formation de bulles.
14. Placer la plaque sur un microscope à contraste de phase et examiner chaque puits. Lire la plaque de gauche à droite et de droite à gauche suivant le schéma du tableau de résultats:
 - de 1A à 1F, de 2F à 2A, etc. (72 puits)
 - de 1A à 1H, de 2H à 2A, etc. (96 puits)
15. Noter les réactions observées dans le tableau de résultats fourni.

CONTROLE QUALITE

- a. Le contrôle positif se trouve dans le puits 1A. Le test est validé s'il y a plus de 51% de cellules mortes par rapport au contrôle négatif.
- b. Le contrôle négatif se trouve dans le puits 1B. Les lymphocytes ne doivent pas être détruits par le sérum dans ce puits afin que la limite de viabilité de la préparation lymphocytaire puisse être déterminée par la réaction. La viabilité doit être comprise entre 0 et 20 % pour que le test soit validé. Les autres réactions de la plaque sont enregistrées par l'évaluation de la viabilité en comparaison avec ce contrôle négatif.

RESULTATS ET INTERPRETATION

La lyse cellulaire doit se produire dans les puits pour lesquels l'antigène de surface présent sur les lymphocytes à tester et les anticorps présents dans les antisérums correspondent. En utilisant un microscope à contraste de phase, les cellules vivantes apparaissent brillantes et réfractiles, alors que les cellules mortes peuvent apparaître un peu plus larges et tachées de noir par l'éosine.

L'éosine à la concentration utilisée, est efficace seulement avec un microscope à contraste de phase. Sans ce contraste de phase, les cellules mortes ne peuvent pas apparaître suffisamment noires pour permettre une distinction correcte. Parce que le gonflement des cellules mortes augmente avec l'addition de l'éosine, il est important de permettre au colorant de pénétrer les cellules mortes pendant exactement 5 minutes, avant l'addition du formaldéhyde.

Les résultats sont notés de 1 à 8 suivant le pourcentage de cellules mortes (observées larges, noires et non réfractiles) présentes dans chaque puits.

8 = 81-100 % de cellules mortes
6 = 51-80 % de cellules mortes
4 = 21-50 % de cellules mortes
2 = 11-20 % de cellules mortes
1 = 0-10 % de cellules mortes
0 = non lisible

Suite à l'enregistrement des résultats, comparer les réactions positives aux spécificités contenues dans chaque puits. Les réactions positives se produisent lorsque les antigènes sur les lymphocytes correspondent aux anticorps présents dans les antisérums. Identifier les antigènes présents dans la préparation lymphocytaire testée.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Des résultats erronés peuvent apparaître à plusieurs étapes. Ceux-ci sont rassemblés suivant les étapes du mode opératoire.

a) Identification cellulaire

Lorsque plusieurs échantillons sont testés en même temps, les erreurs suivantes peuvent apparaître pendant l'isolement ou le test :

1. Interchanger les cellules.
2. Tester une cellule 2 fois et en oublier une autre.
3. Mélanger 2 échantillons pendant l'isolement.

b) Isolement cellulaire

La préparation des lymphocytes doit être la plus pure possible. Une contamination cellulaire peut causer les problèmes suivants:

1. Une contamination érythrocytaire peut provoquer une lecture difficile au microscope suite à une confusion avec les lymphocytes. De plus, les érythrocytes peuvent épuiser le complément nécessaire à la réaction lymphocytotoxique.
2. Une contamination plaquettaire peut absorber les anticorps ainsi que le complément, provoquant de fausses réactions négatives.
3. Une contamination granulocytaire peut provoquer de fausses réactions positives due au phagocytage de l'éosine.

4. La concentration cellulaire est aussi importante car le test est standardisé selon un certain rapport antigène-anticorps. Une concentration cellulaire $< 2 \times 10^6$ lymphocytes / ml peut produire de fausses réactions positives, alors qu'un excès ($> 2 \times 10^6$ lymphocytes / ml) peut induire de fausses réactions négatives.

c) Ajout de lymphocytes

Etant donné que l'ajout de lymphocytes dans les puits peut se faire rapidement, plusieurs erreurs peuvent se produire:

1. Erreur dans le mélange des lymphocytes avec les antisérums (cause fréquente de réactions négatives).
2. Saut d'un puits ou d'une rangée de puits.
3. Transport d'un antisérum d'un puits à l'autre avec la seringue.

d) Lecture au microscope

Cette étape est la source principale d'erreurs d'inattention telles que lire la plaque dans le mauvais sens ou encore erreurs lors de l'enregistrement des résultats. Il est essentiel d'avoir un microscope à contraste de phase parfaitement adapté afin de bien différencier les cellules mortes et vivantes.

e) Température

La lymphocytotoxicité est dépendante de la température. Une température de 20-25°C est requise pour effectuer l'analyse.

f) Complément

Le complément de lapin doit être non toxique pour les lymphocytes normaux. Il est recommandé de le manipuler avec précautions. Il doit être complètement décongelé, mélangé (doucement). NE PAS recongeler le complément de lapin.

Une contamination bactérienne des réactifs ou des préparations lymphocytaires peut provoquer de fausses réactions négatives.

PERFORMANCES

Des études de reproductibilité ont démontré la présence de moins de 2% de réactions irrégulières. Une comparaison des résultats obtenus avec les plaques de typage HLA et ceux obtenus par la méthode de typage à l'ADN ont démontré une concordance de 97.4%. La sensibilité et la spécificité du produit en lui-même ne peuvent être déterminées; par contre la sensibilité et la spécificité de chaque antisérum inclus dans la plaque sont fournies sur le tableau d'analyse des antisérums. Une réactivité positive correspond à une lyse cellulaire de 50% ou plus causée par les anticorps contenus dans l'antisérum.

Les parenthèses indiquent les spécificités pouvant être prises en compte pour une réactivité positive.

La spécificité de chaque antisérum a été confirmée avec un panel de 50 cellules congelées par un laboratoire indépendant, accrédité par "l'American Association of Blood Banks (AABB)" et "l'American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)" ainsi qu'avec un panel de 75 échantillons frais représentant divers groupes ethniques ou avec un panel d'environ 125 échantillons frais représentant divers groupes ethniques.

Le tableau d'analyse des antisérums est un résumé de ces résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Histocompatibility Testing 1980 : Report of an International Workshop and Conference, Los Angeles 1980, Ed. Terasaki, P.I., Los Angeles, CA. UCLA Tissue Typing Laboratory UCLA.
2. Histocompatibility Testing 1984 : Report of the Ninth International Histocompatibility Workshop, Munich and Vienna 1984, Eds. Albert, E.D. ; Baur, M.P. ; Mayr, W.R.
3. Topics in Clinical Histocompatibility Testing : Vol 1 : Schacter, B., Ed. in Chief, 1979. American Association for Clinical Histocompatibility Testing.
4. Manual of Tissue Typing Techniques : (1979) Ed. Ray, J.G., NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20205. Publ. No. 80-545.
5. Miller, W.V. and Rodey, G : 1981. HLA Without Tears. Chicago : Educational Products Division ASCP.
6. Mittal, K.K. Standardization of the HLA Typing Methods and Reagents. Vox Sang 34 : 58-63. 1978.
7. Microdroplet Testing for HLA-A, -B, -C, and -D Antigens. American Journal of Clinical Pathology. Volume 69, Number 2, February 1978, pages 103-120.
8. Rodey, G.E. : 2000. HLA Beyond Tears, 2nd edition.
9. ASHI : 2000. ASHI Laboratory Manual, 4th edition.



HLA Typing Tray

Plaques de typage des antigènes HLA DE CLASSE I

- Usage in vitro
- C onserver à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$

GTi DIAGNOSTICS®

Good science starts with people.®

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



REF

72, 72BL, 72L, 72OR, 72AB1/72AB2, 72C,
72ABC1/ 72ABC2, 96, 96C

Rev. 2008-11-04 (F)



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

www.gtidiagnostics.com