

HLA Typisierungsplatten
Klasse I (ABC)
(72, 72BL, 72L, 72OR, 72AB1/72AB2, 72C
72ABC1/72ABC2, 96, 96C)

Einsatzgebiet

Zum Einsatz in der qualitativen Bestimmung von HLA Zelloberflächenantigenen im Komplement abhängigen Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT).

Nur zum in-vitro Gebrauch.

Zusammenfassung und Erläuterungen

Die GTI HLA Typisierungsplatten enthalten spezifische humane Antiseren und eine positive und eine negative Kontrolle. Die positive Kontrolle in Vertiefung 1A enthält einen Anti-Human-Lymphozyten-Antikörper vom Kaninchen. Die negative Kontrolle in Vertiefung 1B enthält ein Serum von einem gesunden männlichen, nicht transfundierten Spender der Blutgruppe AB und zeigt keine zytotoxische Reaktion. Alle verwendeten Antiseren werden serologisch charakterisiert.

Die verschiedenen verfügbaren Plattenkonfigurationen werden den unterschiedlichen Einsatzgebieten gerecht. Es gibt 72er Platten mit A,B-Loci und A,B,C-Loci oder Platten für spezielle ethnische Bevölkerungsgruppen wie Orientalen (72O) oder Negroide (72BL). Die 96er Platten enthalten mehr Seren für eine höhere Auflösung der A,B-Loci und A,B,C-Loci. Die 72C Platten enthalten Seren zur Austestung von Cw1- Cw4 und die 72ABC2 und 96C Platten enthalten Seren zur Austestung von Cw1- Cw8.

Die HLA-Typisierung wird bei Patienten und/oder Spendern im Rahmen von Organtransplantationen, Thrombozytentransfusionen, Knochenmarktransplantationen und bei bestimmten assoziierten Erkrankungen angewandt.

Testprinzip

Viable Lymphozyten werden mit spezifischen Antiseren und Kaninchen-Komplement inkubiert.

Wenn die Antigenen auf der Zelloberfläche mit den korrespondierenden Antikörpern in den vorgetropften Seren reagieren, sterben die Zellen ab. Die lysierten Zellen werden durch Färbung mit Eosin sichtbar gemacht und im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. Die Interpretation der Ergebnisse wird mit dem beiliegenden Sera Analysis Bogen unterstützt.

Reagenzien

- HLA Typisierungsplatten: 72 oder 96 Seren mit Kontrollen.
- Komplement: Kaninchen Komplement, nicht-toxisch gegen normale Lymphozyten.
 - COMP02: 0,5 ml Aliquot oder
 - COMP03: 0,75 ml Aliquot oder
 - COMP07: 5,0 ml Aliquot
- Mineraloel: alle Antiseren auf der Platte sind mit Oel abgedeckt, um der Verdunstung vorzubeugen.

Vorsichtsmaßnahmen

- Alle mitgelieferten Materialien müssen unverdünnt verwendet werden.
- Die Platten sollten bei -65°C oder kälter aufbewahrt werden.
- Nur bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.
- Tauen Sie die Platten bei Raumtemperatur 15 Minuten auf und verwenden Sie sie innerhalb von 30 Minuten nach dem Auftauen. Nicht wieder einfrieren!
- Lagern Sie geöffnete Beutel nicht im Trockeneis.

Warnung

- Alle für die Herstellung der HLA Typisierungsplatten verwendeten Materialien humanen Ursprungs wurden mit FDA-lizenzierten Tests auf HIV, HCV und HBsAg geprüft und als nicht reaktiv bewertet. Dennoch sollten sie als potentiell infektiös behandelt und entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.

- Als Konservierung ist einigen Antiseren Natrium-Azid zugesetzt. **Warnung:** Natrium-Azid reagiert auf Blei- und Kupferverbindungen. Alle Kontaktflächen (z.B. Spülbecken) mit reichlich Wasser spülen. Natrium-Azid ist ein Gift und wirkt im Körper toxisch.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

Probengewinnung

Pheripäres Blut entnommen mit Natrim-Heparin, ACD oder kryokonservierte Zellen können eingesetzt werden. Natrium-Heparin und ACD Entnahmen sollten bei Raumtemperatur bis zur Lymphozytenisolation gelagert werden und innerhalb von 24-48 Stunden nach Entnahme verarbeitet werden.

- Entnehmen Sie die Patientenproben vor einer Knochenmarktherapie des Patienten.
- Entnehmen Sie die Proben vor Transfusion oder bis spätestens 48 Stunden nach Transfusion.
- Vermeiden Sie Kontaminationen mit Thrombozyten. Dieses kann zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Auch Zellpräparationen von **Lymphknoten und der Milz** können eingesetzt werden. Die Zellen sollten möglichst schnell nach Entnahme eingesetzt werden.

Durchführung

Die Testdurchführung entspricht den Empfehlungen des Herstellers. Anwender spezifische Variationen (Fluoreszenz, Inkubationszeiten oder Zellkonzentration) sind möglich, müssen aber von diesem validiert werden. GTI übernimmt dafür keine Verantwortung.

Mitgelieferte Materialien:

- HLA ABC-Typisierungsplatten
- Recording Sheet/Auswertebogen
- Sera Analysis Bogen
- ABC Komplement

Zusätzlich benötigte Materialien:

- Lymphozytensuspension in fetalem Kälberserum (5%) in RPMI-1640
- 0.05 ml Mikroliterspritze zur Abgabe von 1 µl
- 0.25 ml Mikroliterspritze zur Abgabe von 5 µl
- Mikrodispenser 6fach, 1 ml zur Abgabe von 3,3 µl
- Deckgläser (75 x 50 mm)
- Eosin Y: 5% in Hanks Solution lösen und durch Whatman Filterpapier filtrieren
- Formaldehyd: Geben Sie 2 ml Phenolrot (0,5%) zu 500 ml Formaldehyd (10%). Der pH-Wert muss auf 7.2 mit konzentrierter Natronlauge (HCl) eingestellt werden.
- umgekehrtes Phasenkontrastmikroskop

Testdurchführung

1. Präparieren Sie die Zellen gemäß Ihrer Labor internen Verfahren für Lymphozytotoxizitätsteste.
2. Viabilität der Zellen überprüfen. Sie sollte bei min. 85% liegen.
3. Zellzahl einstellen auf 2×10^6 Zellen/ml in fetalem Kälberserum (5%) in RPMI-1640.
4. Nehmen Sie die Platten aus dem Gefrierschrank und tauen Sie die Platten bei Raumtemperatur 15 bis maximal 30 Minuten auf.
5. Mit der 0.05 ml Spritze vorsichtig 1 µl der 2×10^6 /ml Lymphozyten-suspension unter das Öl pipettieren. Stellen Sie sicher, daß die Zellen und Seren gut gemischt werden.
6. 30 Minuten bei 20-25°C inkubieren.
7. 5 µl des Kaninchen-Komplement mit der 0.25 ml Spritze hinzufügen.
8. 1 Stunde bei 20-25°C inkubieren.
9. 3,3 µl der 5% Eosin-Lösung mit dem Mikrodispenser in jede Vertiefung hinzugeben.
10. Lassen Sie das Eosin 5 Minuten in die toten Zellen penetrieren.
11. 6,6 µl gepufferte Formaldehydlösung mit dem Mikrodispenser in jede Vertiefung geben, um die Reaktionen zu fixieren.
12. Zellen 5-10 Minuten ruhen lassen, bevor sie abgedeckt werden.
13. Lagern Sie Platten, die nicht sofort abgelesen werden können, im Kühlschrank bei 2-8°C, um einer Bläschenbildung vorzubeugen.

14. Lesen Sie die Platten unter dem umgekehrten Phasenkontrastmikroskop mit 100x Vergrößerung in der gleichen Reihenfolge ab wie auf dem entsprechenden Protokollbogen/Recording Sheet vorgegeben:
- 1A bis 1F, 2F bis 2A, etc. bei Platten mit 72 Vertiefungen
 - 1A bis 1H, 2H bis 2A, etc. bei Platten mit 96 Vertiefungen.
15. Protokollieren Sie die Ergebnisse auf dem mitgelieferten Protokollbogen/Recording Sheet.

Qualitätskontrolle

Spezifische Kontrollen

- a) Das positive Kontrollserum in Vertiefung 1A muss mindestens 51% mehr lysierte Zellen enthalten wie das negative Kontrollserum.
- b) In der negativen Kontrolle in Vertiefung 1B sollten keine lysierten Lymphozyten vorkommen; ist sie schwach positiv, so ist dieses bei der Auswertung zu berücksichtigen. Die Viabilität der negativen Kontrolle sollte zwischen 0-20% toter Zellen liegen.

Auswertung der Ergebnisse

Tote Zellen kommen in jeder Vertiefung vor, in der die Zelloberflächeantigene und der Antikörper aus dem Serum korrespondieren. Unter dem Mikroskop kann man die lebenden Zellen, die heller und leuchtender sind, von den toten Zellen, die größer und dunkler durch die Eosin Färbung sind, unterscheiden.

Die Eosin Färbung ist nur wirksam bei Verwendung eines Phasenkontrastmikroskop. Ohne Phasenkontrast erscheinen die toten Zellen für eine sichere Bewertung nicht dunkel genug. Es ist wichtig, bei der Färbung der Zellen mit Eosin genau 5 Minuten einzuhalten, bevor Sie die gepufferte Formaldehydlösung zum Fixieren hinzugeben.

Die Ergebnisse werden mit Scorewerten bzw. Kreuzen, die mit den Prozentanteilen der toten Zellen korrespondieren, angegeben:

Score	8	=	81-100%	tote Zellen	++++	stark positiv
	6	=	51-80%	tote Zellen	+++	positiv
	4	=	21-50%	tote Zellen	++	schwach positiv
	2	=	11-20%	tote Zellen	+	fraglich positiv
	1	=	0-10%	tote Zellen	-	negativ
	0	=	nicht auszuwerten			

Vergleichen Sie die positiven Reaktionen mit den Spezifitäten in den entsprechenden Vertiefungen. Positive Reaktionen treten auf, wo die Antigene mit den Antikörpern im Serum korrespondieren. Identifizieren Sie so die Antigene aus der getesteten Lymphozytenpräparation.

Einschränkungen

Fehler können- nach Kategorien eingeteilt- auftreten bei folgenden Schritten:

a. Zellidentifizierung

Die folgenden Verwechslungen können, während mehrere Proben gleichzeitig isoliert und getestet werden, stattfinden:

1. Verwechslung der Zellen
2. Doppeltestung einer Zelle, Übergehen einer anderen Zelle
3. Verwechslung zweier Proben während der Isolierung

b. Zellisolierung

Die Lymphozytenpräparation muß so rein wie möglich sein, sonst kann es zu folgenden Problemen kommen:

1. Erythrozyten können die mikroskopische Auswertung wegen der Verwechslung mit Lymphozyten erschweren. Die Erythrozyten können zudem das Komplement, das für die zytotoxische Reaktion nötig ist, aufgebrauchen. Dieses führt zu falsch negativen Reaktionen.
2. Kontaminationen durch Thrombozyten führt zur Verringerung des Antikörper- und Komplementgehaltes und führt zu falsch negativen Reaktionen.
3. Kontaminationen durch Granulozyten kann zu falsch positiven Reaktionen führen abhängig von der Phagozytose des Eosin.

4. Die richtige Zellkonzentration ist sehr wichtig, weil die Standardisierung des Tests auf dem richtigen Antigen-Antikörper Verhältnis aufbaut. Eine zu geringe Lymphozytenzahl ($<2 \times 10^6$) kann zu falsch positive Resultaten führen, eine zu große Lymphozytenzahl ($>2 \times 10^6$) führt zu falsch negativen Ergebnissen.
- c. Zugabe der Lymphozyten
Folgende Fehlerquellen sind bei der Zugabe der Zellen möglich:
1. Kein Mischen der Lymphozyten mit den Antiseren (führt zu ganz häufig zu falsch negativen Ergebnissen).
 2. Verwechslung der Vertiefungen oder Reihen.
 3. Verschleppung von Seren durch die Pipettenspitze: carry-over Effekt.
- d. Mikroskopische Auswertung
Die Phase der Auswertung ist anfällig für Fehler, die aus Nachlässigkeit resultieren wie z.B. das Lesen der Platte in falscher Abfolge oder falsches Notieren der Ergebnisse. Außerdem ist die richtige Mikroskopeinstellung sehr wichtig, um sowohl lysierte wie lebende Zellen richtig bewerten zu können.
- e. Temperatur
Der Mikrolymphozytotoxizitätstest ist ein Temperatur abhängiger Test. Eine Temperatur von 20-25°C wird bei der Durchführung empfohlen.
- f. Komplement
Das verwandte Kaninchenkomplement darf nicht toxisch für normale Lymphozyten sein. Vor der Benutzung muß es ganz aufgetaut werden, gut gemischt und kühl gelagert werden. **Nicht wieder einfrieren.**

Bakterielle Verunreinigung der Reagenzien oder der Lymphozytenpräparationen können zu falsch positiven Reaktionen führen.

Charakteristika der Leistungen

Studien zur Reproduzierbarkeit haben weniger als 2% abweichende Reaktionen gezeigt. Vergleichsstudien zwischen HLA Typisierungsplatten und DNA Typisierungsergebnissen haben eine Übereinstimmung von 97,4% gezeigt. Sensitivität und Spezifität können nicht für das Produkt als Ganzes bestimmt werden. Sensitivität und Spezifität jedes getropften Serums in der Platte sind auf dem Sera Analysis Bogen aufgeführt. Eine positive Reaktion ist definiert mit $\geq 50\%$ Zelltod verursacht durch das Antiserum. Ein Wert in (-) bedeutet, daß diese Spezifitäten mit $\sim 50\%$ Zellen, die diese Zelloberflächenantigene tragen, reagieren.

Alle Antiseren Spezifitäten sind durch ein unabhängiges, ASHI akkreditiertes, Labor mit einem Zellpanel von 50 gefrorenen Zellen bestätigt worden in Kombination mit 75 frischen Zellen verschiedener ethnischer Bevölkerungsgruppen oder mit 125 frischen Zellen verschiedener ethnischer Gruppen. Der Sera Analysis Bogen ist eine Zusammenfassung dieser Testresultate.

Bibliographie

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. Colorado: De Novo, Inc.
9. ASHI: 2000. ASHI Laboratory Manual, 4th edition.



GTI DIAGNOSTICS®

Good science starts with people.®

HLA Typisierungsplatten

Klasse I (ABC)

- Nur zum in-vitro Gebrauch
- Lagerung -65°C oder kälter

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

REF

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



0459

Fassung: 2008-11-04 (G)



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

www.gtidiagnostics.com