

**Piastre Tipizzazione HLA**  
**Classe I (ABC)**  
(72, 72BL, 72L, 72OR, 72AB1/72AB2, 72C  
72ABC1/72ABC2, 96, 96C)

**USO**

Per la determinazione qualitativa degli antigeni di superficie HLA mediante tecnica di linfocitotossicità complemento dipendente.

*Per uso Diagnostico in Vitro.*

**RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST**

Le piastre HLA GTI contengono antisieri umani specifici più un controllo positivo ed un controllo negativo. Il siero di controllo positivo, nel pozzetto 1A è un anticorpo di coniglio anti linfociti umani. Il siero di controllo negativo, pozzetto 1B, deriva da donatore maschio di gruppo AB sano e mai trasfuso non citotossico. Tutti gli antisieri sono identificati mediante tecnica sierologica.

I diversi tipi di piastre forniscono la scelta tra una tipizzazione estesa o più ristretta. La piastra 72 contiene 72 sieri per i loci A,B; o A,B,C; o sieri associati ad altre etnie come l'orientale (72OR) o la nera (72BL). La piastra 96 pozzetti contiene un pannello più esteso di sieri per i loci A,B o A,B,C. La piastra 72C contiene sieri per testare le specificità Cw1-Cw4 e la 72ABC2 e la 96C ieri per testare il Cw1-Cw8.

La caratterizzazione dell'HLA può essere usata in pazienti e donatori nel Trapianto di organi, trasfusione di piastrine, trapianto di midollo osseo e nello studio dell'associazione HLA e malattia.

**PRINCIPIO DEL TEST**

I linfociti sono incubati con antisieri specifici e complemento di coniglio. Gli antigeni se presenti sulla superficie cellulare, si legheranno all'anticorpo corrispondente presente nel siero, causando la morte della cellula. Le cellule morte possono essere esaminate microscopicamente grazie alla colorazione con eosina. L'interpretazione dei risultati viene fatta utilizzando l'accluso foglio Analisi dei Sieri.

**REAGENTI**

- Piastre tipizzazione HLA: 72 o 96 sieri tipizzanti con controlli.
- Complemento: Complemento di coniglio, non-tossico per linfociti normali.
  - COMP02: 0,5 ml
  - COMP03: 0,75 ml
  - COMP07: 5,0 ml
- Olio Minerale: Tutti gli antisieri nei pozzetti sono ricoperti di olio minerale per prevenire l'evaporazione.

**AVVERTENZE**

- Tutti i materiali forniti devono essere usati senza diluizione.
- Conservare le piastre a -65°C o oltre.
- Usare le piastre prima della data di scadenza.
- Tenere le piastre a temperatura ambiente per 15' ed usare entro 30 minuti. Non congelare.
- Non conservare le piastre in ghiaccio secco dopo l'apertura della busta.

**ATTENZIONE**

- Tutti i sieri di derivazione umana usati per la preparazione delle piastre HLA sono stati testati e riscontrati negativi per anticorpi anti-HIV, HCV, e HBsAg usando metodi FDA approvati. Nessun metodo però può garantire l'assoluta assenza di HIV, Virus dell'Epatite C, Epatite B, o altri agenti infettivi. Le piastre HLA dovrebbero, quindi, essere maneggiate come potenzialmente infettive.
- Alcuni sieri contengono sodio azide come conservante. **ATTENZIONE:** sodio azide reagisce con piombo e rame formando azidi metalliche altamente esplosivi. Quando gettato in un lavandino sciacquare con molta acqua per prevenire la formazioni di azidi. Sodio azide é velenoso e tossico se ingerito.
- Gettare ogni componente del kit in accordo con la legislazione locale.

## **RACCOLTA CAMPIONI**

Prelevare i campioni di sangue periferico in eparina sodica, ACD o usare cellule appropriatamente criopreservate.

Prelievo in Eparina Sodica: 10cc di sangue in 143 USP unità di Eparina Sodica. Il sangue eparinato deve essere tenuto a temperatura ambiente per tutto il tempo prima dell'isolamento dei linfociti e dovrebbe essere testato entro 24 - 48 ore dal prelievo.

Prelievo in ACD: il sangue in ACD deve essere tenuto a temperature ambiente per tutto il tempo prima dell'isolamento dei linfociti e dovrebbe essere testato entro 24 - 48 ore dal prelievo.

- I campioni dovrebbero essere prelevati prima della terapia mieloblastica.
- Prelevare i campioni prima della trasfusione di sangue o al massimo entro 48 ore dopo la trasfusione.
- La contaminazione eccessiva di piastrine può mascherare la reazione dei linfociti o causare false reazioni negative.

Possono anche essere usati **linfonodi o milza** di donatori. Lavorare il tessuto il più presto possibile dal suo prelevamento.

## **METODICA**

La metodica descritta rappresenta il protocollo consigliato. L'utilizzatore può stabilire un protocollo apportando delle variazioni (ad es. fluorescenza, tempo di incubazione, concentrazione delle cellule); l'utilizzatore, comunque, è responsabile della determinazione del protocollo accettabile per l'uso con le piastre GTI HLA.

### **Materiale fornito:**

- Piastre tipizzazione HLA
- Foglio di lavoro
- Foglio di analisi dei sieri
- Complemento ABC

### **Ulteriori materiali richiesti:**

- Sospensioni Linfocitarie al 5% Fetal Calf Serum in RPMI-1640.
- Siringa da 0.05 mL con ago e dispensatore a ripetizione (singola o multipla) tarata per dispensare 1 µL.
- Siringa con ago da 0.25 mL e dispensatore a ripetizione (singola o multipla) tarata per dispensare 5 µL.
- Siringa da 1 mL con 6 canali in grado di dispensare 3.3 µL per canale con dispensatore a ripetizione.
- Copri oggetti: 75 X 50 mm
- Complemento di coniglio: non tossico per linfociti normali.
- Eosina Y: 5.0 g per 100 ml HBSS. Filtrare con #1 carta da filtro Whatman.
- Formaldeide: aggiungere 2 mL di fenolo rosso allo 0.5% a 500 mL di formaldeide (10%). Aggiustare il pH 7.2 con HCl concentrato.
- Microscopio a inversione di fase.

### **Metodica:**

1. Preparare le cellule in accordo con le procedure di laboratorio per i test in linfocitotossicità.
2. Determinare se la vitalità delle cellule è accettabile per il test. La vitalità dei linfociti deve essere almeno dell'85%.
3. Aggiustare le cellule alla concentrazione corretta di ( $2 \times 10^6$  cellule/mL) in 5% Fetal Calf Serum in RPMI-1640.
4. Rimuovere la piastra dal freezer e lasciare scongelare per 15 minuti a temperatura ambiente non superare i 30 minuti.
5. Usando una siringa con ago da 0.05 mL, aggiungere con attenzione 1 µL di sospensione di linfociti ( $2.0 \times 10^6$  cellule/mL) sotto la superficie dell'olio. Controllare che sieri e cellule siano ben miscelati.
6. Incubare per 30 minuti a 20-25°C.
7. Usando una siringa con ago da 0.25 mL attaccata al dispensatore a ripetizione dispensare 5 µL di complemento di coniglio.
8. Incubare per 1 ora a 20-25°C.
9. Aggiungere 3.3 µL di Eosina al 5% ad ogni pozzetto usando un microdispensatore.
10. Lasciare penetrare l'eosina nelle cellule morte per 5 minuti.
11. Aggiungere 6.6 µL di Formalina tamponata ad ogni pozzetto per fissare la reazione.
12. Lasciare fissare le cellule per 5-10 minuti prima di coprire con copri oggetto da 75 x 50.
13. Conservare le piastre in frigorifero, se non lette immediatamente, per ridurre la formazione di bolle.
14. Porre la piastra su microscopio ad inversione di fase ed esaminare ogni pozzetto ad ingrandimento 100X. Leggere la piastra con movimento serpentino seguendo il foglio di lavoro:
  - Da 1A a 1F; da 2F a 2A, ecc. (piastre 72 pozzetti)

- Da 1A a 1H; da 2H a 2A, ecc. (piastra 96 pozzetti)
15. Registrare le reazioni sul foglio di lavoro.

### **Controllo di qualità:**

Controlli specifici

- a) Il siero di controllo positivo è nel pozzetto 1A. Per essere validato il test deve avere cellule morte per il 51% in più rispetto al controllo negativo.
- b) Il siero di controllo negativo è nel pozzetto 1B. In questo pozzetto non ci devono essere cellule morte causate dal siero. In linea di massima la vitalità dei linfociti può essere stabilita dalla reazione. Altre reazioni nella piastra sono valutate comparando la vitalità con la vitalità del controllo negativo, che dovrebbe essere 0-20% di cellule morte.

### **INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Le cellule morte dovrebbero essere viste in ogni pozzetto dove gli antigeni di superficie legano i corrispondenti anticorpi nei sieri. Al microscopio le cellule vive sono rifrangenti e brillanti, mentre le cellule morte appaiono piuttosto larghe e colorate di scuro con eosina.

L'Eosina nella concentrazione raccomandata in questa metodica è efficace solo con il microscopio a contrasto di fase. Senza contrasto di fase le cellule morte non appaiono sufficientemente scure per permettere la corretta discriminazione. Il rigonfiamento delle cellule morte cresce alla aggiunta dell'eosina, è quindi importante lasciare penetrare il colorante nelle cellule morte per 5 minuti esatti prima di aggiungere la formalina.

I risultati sono registrati usando un sistema gradiente che corrisponde alla percentuale di cellule morte (viste come larghe, scure, non rifrangenti), in ogni pozzetto.

- 8 = 81-100% di cellule morte
- 6 = 51-80% di cellule morte
- 4 = 21-50% di cellule morte
- 2 = 11-20% di cellule morte
- 1 = 0-10% di cellule morte
- 0 = Non leggibile

Dopo aver registrato i risultati, confrontare le reazioni positive con le specificità dei sieri contenuti nei pozzetti. Le reazioni positive avvengono quando l'antigene sui linfociti corrisponde all'anticorpo presente nel siero. Identificare l'antigene presente sulla preparazione linfocitaria testata.

### **LIMITAZIONI**

Risultati errati possono verificarsi in diversi stadi, raggruppati di seguito in accordo agli step della metodica.

#### a. Identificazione delle cellule

Quando si testano più campioni in contemporanea possono verificarsi i seguenti errori durante l'isolamento o il test:

1. Scambio di cellule
2. Test di una cellula due volte omettendone un'altra
3. Miscelazione di due campioni durante l'isolamento

#### b. Isolamento delle cellule

La preparazione dei linfociti deve essere più pura possibile. La contaminazione delle cellule può causare i seguenti problemi:

1. La contaminazione con eritrociti rende difficile la lettura microscopica perché possono essere confuse con i linfociti. Inoltre gli eritrociti possono esaurire il complemento necessario per la reazione linfocitotossica.
2. La contaminazione con piastrine può esaurire l'anticorpo e il complemento, causando reazioni falso negative.
3. La contaminazione con granulociti può causare reazioni falsamente positive a causa della fagocitosi dell'eosina.
4. La concentrazione cellulare è importante fino a che il test è standardizzato usando una media antigene-anticorpo. La sospensione cellulare  $<2 \times 10^6$  linfociti può produrre reazioni falsamente positive. Sospensioni cellulari  $>2 \times 10^6$  linfociti può produrre reazioni falsamente negative.

c. Aggiunta dei linfociti

Poiché la dispensazione dei linfociti va eseguita velocemente, si possono potenzialmente verificare vari errori:

1. I linfociti non si miscelano adeguatamente con gli antisieri (causa comune di reazioni falsamente negative).
2. Omissione di un pozzetto o di una fila di pozzetti.
3. Trascinamento con il puntale del siero da un pozzetto al seguente.

d. Valutazione microscopica ("lettura")

Questa fase è suscettibile soprattutto di errori di attenzione come lettura della piastra al contrario o errori di registrazione dei risultati. E' necessario avere un microscopio a contrasto di fase appropriatamente equipaggiato per vedere sia le cellule morte che le cellule vive.

e. Temperatura

Il test di microlinfotossicità è temperatura dipendente. Per l'esecuzione del test è richiesta una temperatura di 20-25°C.

f. Complemento

Il complemento di coniglio deve essere non tossico per i linfociti normali. Va maneggiato con attenzione, deve essere completamente scongelato, gentilmente miscelato e conservato continuamente fresco prima dell'uso. **NON RICONGELARE.**

La contaminazione batterica dei reagenti o dei linfociti può causare reazioni falsamente positive.

### **CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST**

Studi sulla riproducibilità hanno dimostrato la presenza di meno del 2% di reazioni errate. Studi comparativi di tipizzazione sierologica e molecolare mostrano il 97.4% di concordanza. Sensibilità e specificità del prodotto non possono essere determinati nel loro insieme, comunque la sensibilità e la specificità di ogni siero tipizzante incluso nella piastra sono indicate nel foglio dell'analisi dei sieri. La positività è definita come la presenza del 50% o più di cellule morte causate dall'antisiero. Le parentesi indicano le specificità che reagiscono notoriamente con (~50%) le cellule che posseggono i corrispondenti antigeni .

La specificità dell'antisiero è stata confermata testandolo con un pannello a 50 cellule congelato da un laboratorio di immunogenetica, non affiliato, ma accreditato dall'American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) insieme a 75 campioni freschi rappresentanti individui delle varie etnie o testando un pannello di circa 125 campioni freschi rappresentanti individui delle varie etnie. Il foglio di Analisi dei Sieri riassume i risultati ottenuti con i pannelli sopra descritti.

## **BIBLIOGRAFIA**

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, 2<sup>nd</sup> edition. Colorado: De Novo, Inc.
9. ASHI: 2000. ASHI Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> edition.



**GTi DIAGNOSTICS®**

Good science starts with people.®

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



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

Rev. 2008-11-04 (I)



0459

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



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