

Placa Tipaje HLA
Clase I (ABC)
(72, 72BL, 72L, 72OR, 72AB1/72AB2, 72C
72ABC1/72ABC2, 96, 96C)

PROPÓSITO DEL TEST

Para uso en la determinación cualitativa de antígenos de superficie de célula HLA utilizando la técnica microlinfocitotóxica complemento-dependiente.

Para Uso en Diagnóstico in Vitro.

SUMARIO Y EXPLICACIÓN DEL TEST

Las Placas GTI de Tipaje HLA contienen antisueros específicos humanos y además un control positivo y uno negativo. El control positivo, pocillo 1A, es un anticuerpo linfocito conejo anti-humano. El suero control negativo, pocillo 1B, procede de un grupo de varones sanos AB no trasfundidos y no tiene reactividad citotóxica. Todos los antisueros se han caracterizado por pruebas serológicas.

Los diferentes tipos de placas disponibles permiten varias opciones de análisis abreviadas o más extensas. Las placas de 72 contienen sueros para determinar los loci A,B ; A,B,C ; o loci asociados a la etnia como en el caso de las placas oriental (72OR) o negra (72BL). La placa de 96 pocillos contiene una batería de sueros más extensa para determinar los loci A,B o A,B,C. La placa 72C contiene sueros para Cw1-Cw4 y la placa 72ABC2 y 96C sueros para Cw1-Cw8.

La caracterización HLA puede usarse para evaluación del paciente y/o del donante aplicable a Transplante de Organos, Transfusión de Plaquetas, Transplante de Médula Osea y Estudios de Asociación de Enfermedades.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Se incuban linfocitos viables con antisueros específicos y complemento de conejo. Si los antígenos presentes en la superficie de la célula corresponden a anticuerpos en los sueros se producirá la muerte celular. Las células muertas pueden observarse utilizando un microscopio de fase después de la diferenciación con eosina como colorante. La interpretación de resultados se facilita con la Tabla de Analisis de sueros incluida.

REACTIVOS

- Placas de Tipaje HLA: 72 o 96 sueros de tipaje con controles.
- Complemento: Complemento de Conejo, no tóxico a los linfocitos normales.
COMP02: 0.5 ml
COMP03: 0,75 ml
COMP07: 5,0 ml
- Aceite Mineral: Todos los antisueros de la placa están cubiertos con aceite mineral para evitar la evaporación.

PRECAUCIONES

- Todos los materiales suministrados deben usarse sin diluir.
- Almacenar las placas a -65°C o inferior.
- Utilizar las placas antes de la fecha de caducidad.
- Descongelar las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos y utilizarlas en los 30 minutos después de descongelar. No volver a congelar.
- No almacenar las placas en hielo seco después de haber abierto la bolsa hermética.

AVISO

- Todos los sueros humanos utilizados en la preparación de las placas de Tipaje HLA se han testado y encontrado negativos para anticuerpos a HIV, HCV, y HBsAg por métodos aprobados por la FDA. Sin embargo ningún método puede ofrecer seguridad absoluta de ausencia de HIV, virus de Hepatitis C, virus de Hepatitis B , u otros agentes infecciosos. Por tanto las placas de tipaje HLA deberían manipularse del mismo modo que se haría con material potencialmente infeccioso.

- Algunos de los sueros pueden contener azida sódica como conservante
ATENCIÓN: La azida sódica reacciona con las cañerías de plomo y cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Cuando se elimine por el fregadero debe aclararse con un gran volumen de agua para evitar la formación de azidas. La azida sódica es un veneno y es tóxica si se ingiere.
- Una vez gastado el kit, eliminar todos sus componentes de acuerdo con las regulaciones locales.

RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES

Se puede utilizar para el análisis muestras de **Sangre Periférica** extraídas en Heparina Sódica, ACD o células criopreservadas utilizando técnicas aceptables.

Extracción en Heparina Sódica: 10cc de sangre en 143 unidades USP de Heparina Sódica. La sangre heparinizada debería conservarse a temperatura ambiente antes de proceder al aislamiento de linfocitos y procesarse dentro de las 24-48 horas de su extracción.

Extracción ACD: La sangre ACD debería conservarse a temperatura ambiente antes de proceder al aislamiento de linfocitos y procesarse dentro de las 24-48 horas de su extracción.

- Deben obtenerse las muestras antes de proceder a terapia mieloablativa.
- Las muestras deben extraerse antes de proceder a transfusión sanguínea o al menos 48 horas después de transfusión sanguínea.
- Un exceso de contaminación por plaquetas puede enmascarar la reacción de los linfocitos o provocar reacciones falso negativas.

También puede utilizarse tejidos de **Nódulos Linfáticos o Bazo** procedentes de donaciones de órganos. Procesar el tejido y realizar el análisis tan pronto como sea posible después de la recolección del tejido.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento del Test indicado es nuestro protocolo recomendado. El usuario puede establecer protocolos con variaciones sobre el procedimiento del test (por ejemplo.: fluorescencia, tiempos de incubación, concentración de células); No obstante el usuario es responsable de determinar protocolos que sean aceptables para el uso con las placas de tipaje HLA GTI.

Material Suministrado:

- Placa Tipaje HLA
- Tabla de recolección de datos
- Tabla de Analisis de Sueros
- Complemento ABC

Material Necesario Adicionalmente (Suministrado por el usuario):

- Suspensión de Linfocitos en 5% de Suero Ternera Fetal en RPMI-1640.
- Jeringa de 0.05 mL con aguja en dispensador repetitivo (sencilla o múltiple) para dispensar 1 µL.
- Jeringa de 0.25 mL con aguja en dispensador repetitivo (sencilla o múltiple) para dispensar 5 µL.
- Jeringa de 1 mL con un cabezal de 6 boquillas capaz de dispensar 3.3 µL por boquilla en dispensaciones repetitivas.
- Cubre Objetos: 75 X 50 mm.
- Eosina Y: 5.0 g por 100 ml HBSS. Filtrado a través de N°1 papel de filtro Whatman
- Formaldehído: Añadir 2 mL de rojo fenol al 0.5% a 500 mL de formaldehído (10%). Ajustar el pH a 7.2 con HCl concentrado.
- Microscopio de fase invertida.

Procedimiento del Test:

1. Preparar las células de acuerdo con los procedimientos del laboratorio del usuario para análisis de linfocitotoxicidad.
2. Determinar si la viabilidad celular es aceptable para el test. La viabilidad de los linfocitos debe ser del 85% como mínimo.
3. Ajustar las células a la concentración deseada de (2×10^6 cels/mL) en 5% de Suero Ternera Fetal en RPMI-1640.
4. Sacar la placa del congelador y dejar descongelar al menos 15 minutos a temperatura ambiente, pero no más de 30 minutos.
5. Utilizando una jeringa con aguja incorporada de 0.05 mL, añadir con cuidado por debajo del aceite 1 µL de una suspensión de linfocitos de 2.0×10^6 cells/mL. Asegurarse de que las células y el suero se mezclan adecuadamente.
6. Incubar 30 minutos a 20-25°C.
7. Utilizando una jeringa de 0.25 mL con aguja incorporada unida a un dispensador repetitivo añadir 5 µL de Complemento de Conejo.

8. Incubar una hora a 20-25°C.
9. Añadir 3.3 µL de Eosina 5% a cada pocillo utilizando un microdispensador.
10. Dejar que la Eosina penetre en las células muertas durante 5 minutos.
11. Añadir 6.6 µL de Formalina Tamponada a cada pocillo para fijar la reacción.
12. Dejar reposar las células 5-10 minutos antes de cubrir los pocillos con un cubre de 75 x 50 mm.
13. Si no van a leerse inmediatamente, almacenar las placas en el refrigerador para reducir la formación de burbujas.
14. Colocar la placa en un microscopio de fase invertida y examinar cada pocillo a 100X aumentos. Leer la placa según el siguiente patrón en zig-zag que corresponde a la Tabla de Resultados:
 - 1A a 1F; 2F a 2A, etc. (placas de 72 pocillos)
 - 1A a 1H; 2H a 2A, etc. (placa de 96 pocillos)
15. Anotar las reacciones observadas en la Tabla de Resultados suministrada.

Control de Calidad:

Controles Específicos

- a) El suero Control Positivo se encuentra en el pocillo 1A. Para que el Test sea válido el control positivo tendrá al menos una cantidad del 51% mayor de células muertas que las del control negativo.
- b) El suero Control Negativo se encuentra en el pocillo 1B. No debería apreciarse muerte celular en este pocillo. La línea base de la preparación de linfocitos puede determinarse por la reacción. Otras reacciones en la placa se evalúan comparando la viabilidad a la viabilidad del control negativo la cual debería estar entre 0-20% células muertas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En cualquier pocillo en que se emparejen el antígeno de superficie celular y el antisuero ocurrirá muerte celular. Las células vivas aparecerán brillantes y refractantes al observarlas en un microscopio de fase, mientras que las células muertas aparecen algo mayores y teñidas de oscuro por el colorante Eosina.

El colorante Eosina en las concentraciones recomendadas en este procedimiento sólo es efectivo si se usa un microscopio de contraste de fase. Sin el contraste de fase las células muertas no aparecen suficientemente oscuras para permitir una discriminación adecuada. El abombamiento de las células muertas se incrementa por la adición de la Eosina, es importante por tanto dejar que el colorante penetre durante exactamente 5 minutos antes de la adición de formalina.

Los Resultados se registran utilizando un sistema de puntuación que corresponde al porcentaje de células muertas (observadas como mayores, oscuras y no refractantes), dentro de cada pocillo.

- 8 = 81-100% células muertas
- 6 = 51-80% células muertas
- 4 = 21-50% células muertas
- 2 = 11-20% células muertas
- 1 = 0-10% células muertas
- 0 = Ilegible

Después de registrar los resultados, comparar las reacciones positivas a las especificidades contenidas en cada pocillo. Las Reacciones dan positivo cuando los antígenos de los linfocitos corresponden a los anticuerpos presentes en el antisuero. Identificar los antígenos presentes en la preparación de linfocitos analizada.

LIMITACIONES

Pueden producirse resultados erróneos en diferentes fases del proceso. A continuación se agrupan de acuerdo a los pasos del proceso.

a. Identificación celular

Cuando se analizan varias muestras simultáneamente, pueden producirse los siguientes errores al confundirlas en el aislamiento o al analizarlas:

1. Intercambiar las células
2. Analizar dos veces una célula, mientras se omite otra.
3. Mezclar dos muestras durante el aislamiento

b. Aislamiento Celular

La preparación de linfocitos debe ser tan pura como sea posible. La contaminación celular puede provocar los siguientes problemas:

1. La contaminación por Eritrocitos puede dificultar la evaluación al microscopio al confundirse con los linfocitos. Los Eritrocitos también pueden reducir el complemento necesario para la reacción linfocitotóxica.
2. La contaminación por Plaquetas puede mermar anticuerpos y complemento y por tanto provocar reacciones falso negativas.
3. La contaminación por Granulocitos puede provocar falsos positivos debido a la fagocitosis de la Eosina.
4. La Concentración Celular también es importante dado que el test está estandarizado utilizando un determinado cociente antígeno-anticuerpo. Las suspensiones de Células de $<2 \times 10^6$ linfocitos pueden dar reacciones falso positivas. Las suspensiones de Células de $>2 \times 10^6$ linfocitos pueden dar reacciones falso negativas.

c. Adición de los linfocitos

Dado que la adición de linfocitos puede realizarse rápidamente, pueden suceder los siguientes errores:

1. Fallo en la mezcla de los linfocitos con el antisuero (esto es una causa común de reacciones negativas).
2. Saltarse un pocillo o fila de pocillos.
3. Arrastre de sueros de un pocillo al otro por las puntas de dispensación.

d. Evaluación al Microscopio (“lectura”)

Esta fase es principalmente susceptible de errores por falta de cuidado tales como leer una placa en orden inverso o errores al apuntar. Es esencial tener el Microscopio de contraste de fases ajustado adecuadamente para ver tanto las células vivas como las muertas.

e. Temperatura

El test de microlinfocitotoxicidad es sensible a la temperatura. Se requiere una temperatura de 20-25°C para realizar el análisis.

f. Complemento

El complemento de Conejo debe ser no tóxico al los linfocitos normales. Se requiere una manipulación cuidadosa del complemento. Debe estar completamente descongelado, mezclado (suavemente), y mantenerlo frío continuamente antes de su uso. **NO VOLVER A CONGELAR** el complemento de conejo.

La contaminación bacteriana de los reactivos o las preparaciones de linfocitos pueden provocar reacciones falso positivas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Estudios de reproducibilidad confirmaron menos del 2% de reacciones erráticas. Estudios comparativos entre Placas de tipaje HLA y tipaje ADN dieron un 97.4% de concordancia. La Sensibilidad y Especificidad no pueden determinarse para el producto considerado en su totalidad. De todas formas en la Hoja de Análisis de sueros se incluye la sensibilidad y especificidad de cada suero de tipaje incluido en la placa. La reactividad Positiva se define como el 50% o mayor muerte celular provocada por el antisuero. Los paréntesis indican especificidades que se conocen que reaccionan con (~50%) de células poseedoras de esos antígenos.

La especificidad del antisuero ha sido confirmada con un panel de 50 células congeladas por un laboratorio independiente de histocompatibilidad acreditado por la Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Immunogenética (ASHI) en combinación con un panel de aproximadamente 75 muestras frescas de células representando individuos de varias etnias o de un panel de aproximadamente 125 muestras frescas células representando individuos de varias etnias. La Tabla de Análisis de Sueros es un resumen de esos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

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.®

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

REF

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



REV 2008-11-04 (S)

0459



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

www.gtidiagnostics.com