

ThromboStep (2ª Generación)

Kit para la detección de inmunoglobulinas asociadas a plaquetas

Referencia	Test
TBS	50 test



INTRODUCCION

Los rangos normales de plaquetas en humanos oscilan entre 150.000 y 450.000 plaquetas por microlitro de sangre. La Trombocitopenia es la presencia de pocas plaquetas en sangre. La disminución de los recuentos de plaquetas puede ser debida a diferentes procesos patológicos, sin embargo, la cuantificación de plaquetas asociadas a inmunoglobulinas permite relacionar la causa de la trombocitopenia con una disminución de la producción de plaquetas o un aumento en la proporción de su destrucción.

MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit incluye:

- 1 vial anticuerpo monoclonal anti CD42a PE. Este anticuerpo está recomendado para la identificación de Plaquetas y Megacariocitos. Reacciona con una glicoproteína de membrana integral de cadena única de 17-22kDa, también conocido como GPIX.
- 1 vial anti- total inmunoglobulina policlonal humana FITC (Anti-total Igs FITC).
- 1 vial anti- IgA inmunoglobulina policlonal humana FITC.
- 1 vial anti- IgG inmunoglobulina policlonal humana FITC.
- 1 vial anti- IgM inmunoglobulina policlonal humana FITC.
- 1 vial anti- total inmunoglobulina policlonal de conejo FITC (Goat anti-Ig Rabbit FITC)
- 2 botellas de BUFFER DE LAVADO 20X (50 ml) Tyrodé's sin bicarbonato sódico.
- 2 viales de bicarbonato sódico

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos de recolección de sangre con EDTA como anticoagulante.
- Tubos de centrifuga de 12 x 75 mm.
- Solución del 10 mM EDTA, 1% de paraformaldehido y 0.5 % BSA.
- Micropipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 µl, 20 µl, 100 µl y 500 µl
- Centrifuga
- Vortex o agitador
- Citómetro de flujo con láser de 488 nm.
- Oxalato de Amonio (1 L): 1% Amonium Oxalate (Ej. Merk Ref: 101192; Sigma Ref: 09898 o 221716)

USO RECOMENDADO

El kit está dirigido a la detección por citometría de flujo de autoanticuerpos que reaccionan con receptores específicos de plaquetas.

RELEVANCIA CLINICA

La trombocitopenia Inmunitaria o púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) es un trastorno autoinmune que se caracteriza por un recuento bajo de plaquetas y sangrados mucocutáneos. Los autoanticuerpos están dirigidos principalmente contra los receptores plaquetarios específicos CD41a (GPIIb / IIIa) y CD42b (GPIb). Como resultado, las plaquetas sensibilizadas se eliminan rápidamente por los sistemas celulares de monocitos-macrófagos.

La determinación de autoanticuerpos contra trombocitos permite diferenciar la trombocitopenia inmune de la no inmunitaria.

CONDICIONES ADECUADAS DE MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Guardar en oscuridad, refrigerado entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR. El anticuerpo es estable hasta la fecha que aparece en la etiqueta del vial si se almacena entre 2°-8° C. No usar después de esta fecha.

Una vez abiertos los viales de anticuerpos que componen el kit del producto son estables durante un periodo de 90 días.

EVIDENCIAS DE DETERIORO.

Los reactivos no deben ser utilizados si se encuentra alguna evidencia de deterioro. Para más información, contacte con nuestro servicio técnico tech@immunostep.com

Para los viales de anticuerpos, la apariencia normal es la de un líquido semi-transparente e inoloro. No deben aparecer precipitados ni presentar turbidez. No debe presentar olor.

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS.

- a) Los viales de los componentes del kit contienen azida sódica. Bajo condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazónico, un compuesto extremadamente tóxico. Los compuestos de azida deben ser disueltos con agua corriente antes de ser desechados. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde se podrían desarrollar condiciones explosivas. Ficha de datos de seguridad (FDS) disponible en la web www.immunostep.com
- b) Evitar contaminación microbiana del reactivo.
- c) Debe evitarse la exposición a la luz. Use luz tenue durante la manipulación, incubación con células y antes del análisis.
- d) No pipetear con la boca.
- e) En el caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.
- f) Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.
- g) No usar después de la fecha de caducidad establecida en el vial.
- h) Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis.
- i) PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- j) Sólo para uso profesional.

- k) Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN TAMPÓN DE LAVADO (50 ml)

1. Utiliza una probeta para medir 950 ml de agua destilada (H₂O).
2. Vierte el agua de la probeta en un vaso de precipitado.
3. Agrega los 50 ml de uno de los frascos de buffer Tyrode.
4. Añade el bicarbonato de uno de los viales y agita hasta que se disuelva por completo.
5. Filtra la solución utilizando un filtro de 0.45 µM cuando esté completamente disuelta.
6. Transfiere la solución filtrada a una botella de 1 litro y anota la fecha en la que se realizó este paso.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolectar 10 ml de sangre periférica de un individuo control y la misma cantidad del paciente que vamos a analizar, usando EDTA como anticoagulante. La sangre periférica del paciente y del control se divide en dos tubos (4 en total) y se centrifuga a velocidad de 200xg durante 10 minutos para obtener una separación entre el plasma rico en plaquetas y las células de la sangre. ^(1,2)
2. Después de la centrifugación separamos el plasma rico en plaquetas con una pipeta Pasteur evitando recoger células rojas de la sangre. Centrifugamos nuevamente el plasma recogido a una velocidad de 900xg durante 10 minutos para separar las plaquetas del plasma. Decantamos el tubo recogiendo el plasma el cual será guardado a 4° C.

El plasma será utilizado para confirmar el resultado obtenido en el caso de que sea necesario, utilizando plaquetas de individuos sanos.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Resuspendemos el botón de plaquetas que aparece en el fondo del tubo después de decantarlo, en 5 ml de oxalato de amonio e incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente o hasta que se observe la lisis de los posibles eritrocitos de la muestra. El oxalato de amonio es una solución hipotónica que lisa las células rojas de la sangre a las que se han adherido las plaquetas.
2. Después de la incubación centrifugamos a 900 x g durante 10 minutos, decantamos el sobrenadante y resuspendemos el botón de plaquetas en 3 ml de buffer de lavado. Repetimos el proceso dos veces más.
3. Resuspendemos en 3 ml del buffer 1% de paraformaldehído, 10 mM EDTA y 0,5 % de BSA. Incubamos 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavamos las células dos veces con 3 ml de Buffer de Lavado centrifugando a 900 x g durante 10 minutos y decantando el sobrenadante.
5. Después del último lavado, extraemos una muestra para hacer un recuento de plaquetas y dejar la muestra a 100.000 plaquetas/µl con Buffer de lavado.
6. Los tubos con las plaquetas pueden ser almacenados a 4°C hasta una semana.

MARCADO DE LA MUESTRA

Preparamos 5 tubos por cada muestra a analizar incluyendo la muestra control: Anti-inmunoglobulina de conejo, anti-inmunoglobulina humana, anti-inmunoglobulina A humana, anti-inmunoglobulina G humana y anti-inmunoglobulina M humana. Es recomendable hacer los marcajes de la muestra en hielo por lo que debemos preparar un baño de hielo.

7. Añadir a cada tubo 50 ul de su muestra correspondiente.

- **Tubo policlonal Anti-conejo:** Añadir 20µl de FITC Policlonal Anti-conejo Igs + 20 µl de CD42a PE
- **Tubo policlonal Anti-Humano Igs:** Añadir 20µl de FITC Policlonal Anti-Humano Igs + 20 µl de CD42a PE
- **Tubo Policlonal Anti-Humano IgA:** Añadir 20µl de FITC Policlonal Anti-Humano IgA + 20 µl de CD42a PE
- **Tubo Policlonal Anti-Humano IgG:** Añadir 20µl de FITC Policlonal Anti-Humano IgG + 20 µl de CD42a PE
- **Tubo Policlonal Anti-Humano IgM:** Añadir 20µl de FITC Policlonal Anti-Humano IgM + 20 µl de CD42a PE

1. Agitar los tubos en un vorex e incubar durante 30 minutos en la oscuridad a 4° C.
2. Después de la incubación, añadimos 3 ml de Buffer de Lavado, agitamos y centrifugamos a 900 x g durante 10 minutos.
3. Retiramos el sobrenadante por decantación y resuspendemos en 3 ml de Buffer de lavado. Repetimos el lavado una vez más. Después del segundo lavado resuspendemos en 0,5 ml de Buffer de lavado.
4. La muestra ya está lista para ser adquirida al citómetro. Si la muestra no es analizada inmediatamente, almacenarla en oscuridad a 2-8 °C.

ANÁLISIS CITOMETRÍA DE FLUJO

Verificar que el citómetro está alineado y estandarizado para la dispersión de luz en escala logarítmica (log FSC/SSC) y para la intensidad de fluorescencia FL-1 y LF-2 (log FL-1 y LF-2)

Es necesario fijar una región (R1) para seleccionar la población de plaquetas. Para ello se debe hacer un gate en la población de CD42a PE positiva, tal y como aparece en la figura 1.

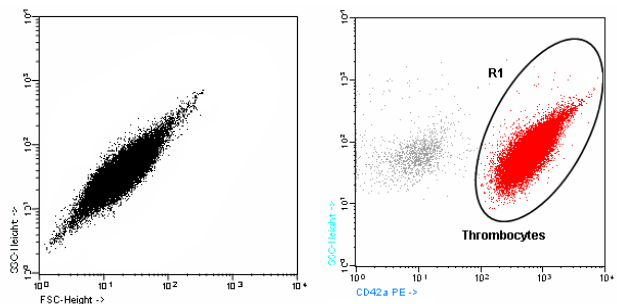
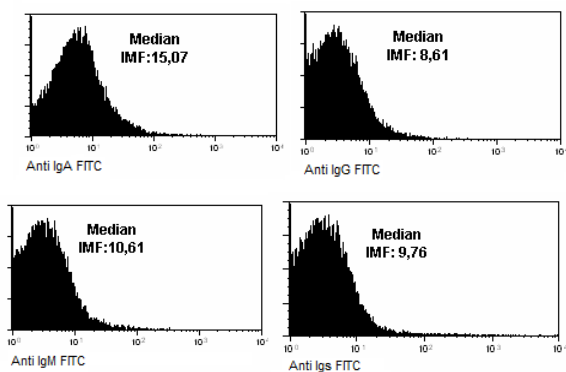


Figura 1. Resultado de citometría. Plaquetas control (eventos rojos) con CD42a PE gate (R1).

A



B

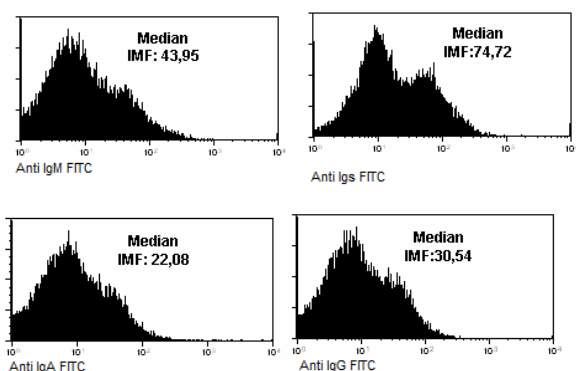


Figura 2. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan la comparación de una muestra de individuo sano (A) frente a una muestra de individuo con trombocitopenia (B).

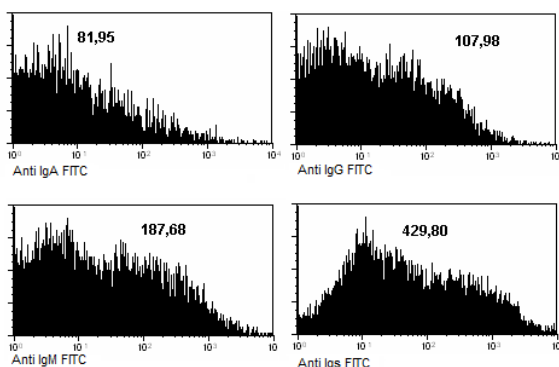


Figura 3. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan una muestra de un individuo con trombocitopenia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Anti-IgA y anti-IgM pueden producir un marcado inespecífico en IgG. En el caso de que la muestra sea positiva para IgG, IgA e IgM sólo considerar la primera.

2. La incubación de los anticuerpos con las células sin seguir los procedimientos recomendados puede concluir con una disminución o pérdida de los determinantes antigénicos de la superficie celular.

3. Los valores obtenidos de individuos normales pueden variar entre distintos laboratorios, por tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.

4. Las células anómalas o las líneas celulares pueden mostrar una mayor densidad antigénica que las células normales. Esto podría requerir, en algunos casos, el uso de una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal de la que se indica en los procedimientos de preparación de la muestra.

5. En muestras de sangre completa, los eritrocitos encontrados en muestras patológicas, al igual que las células de la serie roja nucleadas (tanto de muestras normales como patológicas), pueden ser resistentes a la lisis. Se pueden necesitar tiempos más largos de lisis de eritrocitos para evitar la inclusión de las células no lisadas en la región delimitada de los leucocitos.

6. Las muestras de sangre no deberían refrigerarse por un periodo excesivo (más de 24 horas), ya que el número de células viables irá disminuyendo con el tiempo, pudiendo incluso interferir en el análisis. Para obtener mejores resultados, debería mantenerse a temperatura ambiente minutos antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal.

7. Los resultados más precisos con los procedimientos de citometría de flujo dependen de un alineamiento y calibración correctos de los láseres, al igual que del establecimiento de las regiones correctas.

VALORES DE REFERENCIA

Resultados anormales en el porcentaje de células que expresen el antígeno o en los niveles de expresión de éste pueden ser debidos a estados patológicos. Es recomendable conocer los patrones normales de expresión del antígeno para poder hacer una interpretación adecuada de los resultados^{4,5,6}.

Porcentaje en sangre periférica de un paciente sano:

Número de células rojas : 3,8 - 5,6 X10⁶/μL
Plaquetas: 150 - 450 X10³/μL

Los valores obtenidos de individuos sanos podrían variar entre distintos laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.

CARACTERÍSTICAS

Valores de la fluorescencia en FITC de trombocitos de individuos normales en FACSCalibur (BD).

Anticuerpo	Fluorescencia verde (Media)	Valor máximo	Valor mínimo	N
Anti-humano IgA	29,05	99,74	5,45	17
Anti-humano IgG	11,72	72,34	4,43	17
Anti-humano IgM	13,89	68,11	5,25	17
Anti-humano inmunoglobulina	12,37	65,91	3,98	17

Valores de la fluorescencia en FITC de trombocitos de individuos patológicos en FACSCalibur (BD).

Anticuerpo	Fluorescencia verde (Media)	Valor máximo	Valor mínimo	N
Anti-humano IgA	144,63	446,30	23,53	15
Anti-humano IgG	62,58	457,07	13,83	15
Anti-humano IgM	83,54	258,44	20,85	15
Anti-humano inmunoglobulina	91,49	272,37	17,38	14

ESPECIFICIDAD

Para el ensayo de especificidad del kit, se incubaron las Igs anti-humano con perlas de poliestireno recubiertas con inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM y BSA (control) respectivamente.

El análisis de especificidad de las Igs anti-humano muestra una reactividad cruzada muy baja (< 7%) para todos ellos (Fig. 4), lo que facilita la identificación correcta de muestras no patológicas.

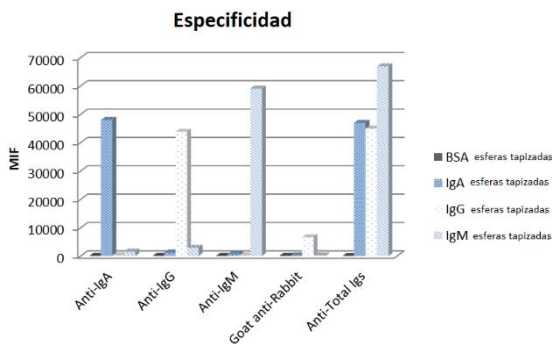


Figura 4: Las perlas de poliestireno recubiertas con inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM y BSA (control) se analizaron mediante citómetro de flujo FACSAria II (Becton Dickinson, San José, CA).

GARANTIA

Los productos de Immunostep tienen garantía en cuanto a la cantidad y el contenido indicado en la etiqueta del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia a cualquier otra garantía. La responsabilidad de Immunostep se limita al remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

1. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture- approved standard; Fifth edition (2003). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H3-A5.
2. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens"; publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
3. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
4. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
5. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, ed. Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. New York: Oxford University Press; 1995.

6. CLSI EP09-A3. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Third Edition.
7. Rosenfeld, C.S. et al. Flow Cytometry measurement of antiplatelet antibodies . Am J Clin Pathol 1987, 87: 5841-522.
8. Ault K.A. Flow Cytometry measurement of platelet associated immunoglobulin. Pathol Immunopathol Res 1988, 7:395-408.

FABRICADO POR:



Immunostep S.L

Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Cancer Research Center (CIC)
Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca (Spain)
Tel. (+34) 923 294 827
www.immunostep.com