

ThromboStep (2.ª generación)

Kit de detección de inmunoglobulina asociada a plaquetas (Kit PAlg)

Referencia	Prueba
TBS-50T	50 test



INTRODUCCIÓN

A El recuento normal de plaquetas oscila entre 150 000 y 450 000 plaquetas por microlitro de sangre en humanos. La trombocitopenia es la presencia de un número relativamente bajo de plaquetas en la sangre. La disminución del recuento de plaquetas puede deberse a diversos procesos patológicos; la cuantificación de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas permite determinar si la causa de la trombocitopenia es una disminución de la tasa de producción de plaquetas o un aumento de la tasa de destrucción.

MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit incluye:

- 1 vial de anticuerpo monoclonal anti-CD42a PE. Recomendado para su uso en citometría de flujo para la identificación de plaquetas y megacariocitos. Reacciona con una glicoproteína de membrana integral de cadena única de 17-22 kDa, también conocida como GPIX.
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra la inmunoglobulina humana total (Anti-Ig totales FITC).
- 1 vial de anticuerpo policlonal marcado con FITC contra la IgA humana.
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra IgG humana.
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra IgM humana.
- 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC contra inmunoglobulinas totales de conejo (anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo FITC)
- 2 frascos de solución de Tyrode sin bicarbonato sódico 20X (2 x 50 ml).
- 2 frascos de bicarbonato sódico
- 1 frasco de solución de oxalato de amonio, 10X.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos de recogida de sangre que contengan EDTA como anticoagulante.
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 12 x 75 mm
- Paraformaldehído al 1 %, EDTA 10 mM y BSA al 0,5 %
- Micropipeta capaz de dispensar volúmenes de 5 µl, 20 µl, 100 µl y 500 µl
- Serofuge o centrifuga equivalente
- Mezclador Vortex
- Citómetro de flujo con longitud de onda de excitación de 488 nm (láser de argón-ion)

USO RECOMENDADO

«Thrombostep» de Immunostep está diseñado para su uso en la detección y cuantificación mediante citometría de flujo de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas.

RELEVANCIA CLÍNICA

La púrpura trombocitopénica inmune (PTI) es un trastorno autoinmune caracterizado por un recuento plaquetario bajo y hemorragias mucocutáneas. Los autoanticuerpos se dirigen principalmente contra los receptores plaquetarios específicos CD41a (GPIIb/IIIa) y CD42b (GPIb). Como resultado, las plaquetas sensibilizadas son eliminadas rápidamente por el sistema de monocitos y macrófagos.

La determinación de autoanticuerpos contra las plaquetas permite diferenciar la trombocitopenia inmunitaria de la no inmunitaria.

CONDICIONES ADECUADAS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Conservar en un lugar oscuro, refrigerado a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C. NO CONGELAR. El anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial si se conserva a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. No utilizar después de la fecha indicada.

Una vez abierto el vial, el producto es estable durante 90 días.

SEÑALES DE DETERIORO

No se deben utilizar los reactivos si se observa cualquier signo de deterioro. Para más información, póngase en contacto con nuestro servicio técnico: tech@immunostep.com

El aspecto normal del producto es el de un líquido semitransparente e incoloro. No debe utilizarse si el medio líquido está turbio o contiene precipitado. Debe ser inodoro.

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

- Los reactivos contienen azida sódica. En condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazoico, un compuesto altamente tóxico. Los compuestos de azida deben diluirse en agua corriente antes de desecharlos. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde podrían desarrollarse condiciones explosivas. La ficha de datos de seguridad (FDS) está disponible en línea en www.immunostep.com
- Evite la contaminación microbiana del reactivo.
- Protéjalo de la luz. Utilice luz tenue durante la manipulación, la incubación con células y antes del análisis.
- Nunca pipete con la boca.
- En caso de contacto con la piel, lávese con abundante agua.
- Las muestras deben manipularse de la misma manera que aquellas capaces de transmitir infecciones. Deben garantizarse los procedimientos de manipulación adecuados.
- No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en el vial.
- Cualquier desviación del procedimiento recomendado podría invalidar los resultados del análisis.
- PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.
- Solo para uso profesional.
- Antes de obtener las muestras, es necesario asegurarse de que el citómetro de flujo esté calibrado y compensado.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE OXALATO DE AMONIO IX (500 ml)

1. Mida 450 ml de H₂O con un cilindro graduado.
2. Transfiera el H₂O a un vaso de precipitados limpio.
3. Añada todo el contenido del frasco de solución de oxalato de amonio IX.
4. Mezcle suavemente hasta que se disuelva por completo y la solución sea homogénea.
5. Ajuste el volumen final a 500 ml con H₂O y mezcle bien.
6. Filtrar a través de una membrana de 0,45 µm en un frasco adecuado y anotar la fecha de preparación.

Nota: El segundo frasco de solución de oxalato de amonio IX debe conservarse tal y como se suministra y prepararse siguiendo el mismo procedimiento una vez que se haya agotado la primera solución IX.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO (50 ml)

1. Mida 950 ml de H₂O utilizando un tubo de ensayo.
2. Transfiera el H₂O del tubo de ensayo a un vaso de precipitados.
3. Añada los 50 ml a uno de los frascos de tampón de Tyrode.
4. Añada el bicarbonato de uno de los viales y agite hasta que se disuelva por completo.
5. Filtrar a través de una membrana de 0,45 µm cuando esté completamente disuelto en una botella de 1 L y anotar la fecha.

TOMA DE MUESTRAS

1. Recoger 10 ml de sangre periférica con EDTA de cada paciente o control individual. Cada muestra, tanto de los pacientes como de los controles, se divide en dos tubos y se centrifuga sin freno a baja velocidad, a 200 x g durante 10 minutos, para obtener una separación entre el plasma rico en plaquetas y la fracción de células sanguíneas^(1,2)
2. Tras la centrifugación, se recoge el plasma rico en plaquetas con una pipeta Pasteur, evitando recoger glóbulos rojos, y el plasma rico en plaquetas se centrifuga con freno a alta velocidad a 900 x g durante 10 minutos. Se decanta el tubo recogiendo el plasma, que se almacena a 4 °C

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

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Resuspender el sedimento de plaquetas que aparece en el fondo del tubo tras el decantado en 5 ml de oxalato de amonio IX e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El oxalato de amonio es una solución hipotónica que lisa los glóbulos rojos adheridos a las plaquetas.
2. Tras la incubación, centrifugue las células a 900 x g durante 10 minutos, decante el sobrenadante y resuspenda el sedimento de plaquetas en 3 ml de tampón de lavado.
3. Centrifugue las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos y decante el sobrenadante. Lave las plaquetas una vez más a 900 x g durante 10 minutos.
4. Resuspender las plaquetas lavadas en 3 ml de paraformaldehído al 1 %, EDTA 10 mM y BSA al 0,5 %. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar las células dos veces con 3 ml de tampón de lavado. Centrifugar las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en 1 ml de tampón de lavado, contando la concentración de plaquetas en un analizador hematológico o con una cámara de conteo para que sea de 100 000/µl o menos.
7. Por último, los tubos se conservan durante al menos 2 horas o una semana a 4 °C para reducir la cantidad de anticuerpos unidos de forma inespecífica.

MÉTODO DE ETIQUETADO DE MUESTRAS

1. Se marcan cinco tubos para cada paciente o control (inmunoglobulinas policlonales anti-conejo; inmunoglobulinas policlonales anti-humanas; IgA policlonal anti-humana; IgG policlonal anti-humana; IgM policlonal anti-humana). Se recomienda realizar el marcado de las plaquetas con anticuerpos en hielo. Prepare un baño de hielo.
2. Añada 50 µl de muestra de plaquetas o control con Ig anti-humanas a cada tubo.
 - **Tubo de anticuerpos policlonales anti-conejo:** Añada 20 µl de anticuerpos policlonales anti-conejo marcados con FITC + 20 µl de CD42a marcado con PE
 - **Tubo de anticuerpos policlonales anti-IgG humanas:** Añada 20 µl de anticuerpos policlonales anti-IgG humanas marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
 - **Tubo de anticuerpos policlonales anti-IgA humana:** Añada 20 µl de anticuerpos policlonales anti-IgA humana marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
 - **Tubo de anticuerpo policlonal anti-IgG humana:** Añadir 20 µl del anticuerpo policlonal anti-IgG humana marcado con FITC + 20 µl de CD42a marcado con PE
 - **Tubo de anticuerpo policlonal anti-IgM humana:** Añadir 20 µl del anticuerpo policlonal anti-IgM humana marcado con FITC + 20 µl de CD42a marcado con PE
3. Agite con el vórtex e incube las muestras durante 30 minutos en un baño de hielo a oscuras.
4. Añada 3 ml de tampón de lavado a cada tubo, mezcle las muestras y centrifugue las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos. Repita el lavado una vez más.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 500 µl de tampón de lavado.
6. Analizar mediante citometría de flujo. Si las muestras no se van a analizar inmediatamente, conservarlas en la oscuridad a 2-8°C.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Compruebe que el citómetro esté alineado y calibrado para la dispersión de la luz (FSC/SSC en escala logarítmica) y la intensidad de fluorescencia (FL1, FL2 en escala logarítmica). Es necesario establecer una región (R1) para seleccionar la población de plaquetas. Establezca la R1 alrededor de la población positiva para CD42a PE (trombocitos). Adquiera al menos 10 000 eventos en la región 1 (R1).

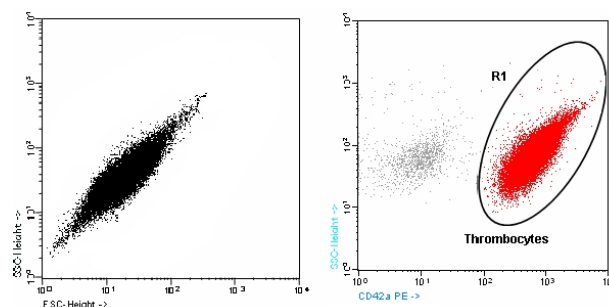
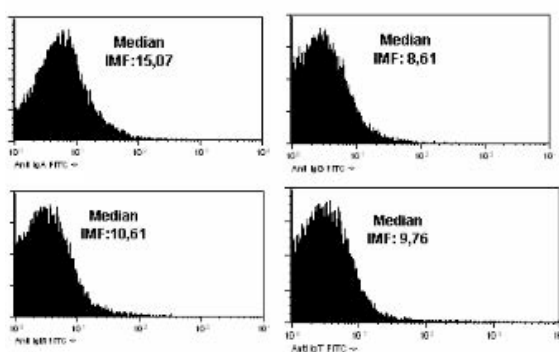


Figura 1. Los trombocitos de control (eventos rojos) son células que se encuentran dentro del filtro de CD42a (R1). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

A



B

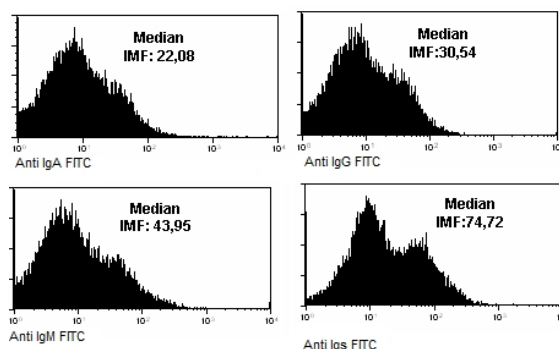


Figura 2. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan la comparación de una muestra de control sana (A) y muestra de trombocitopenia inmune (B). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

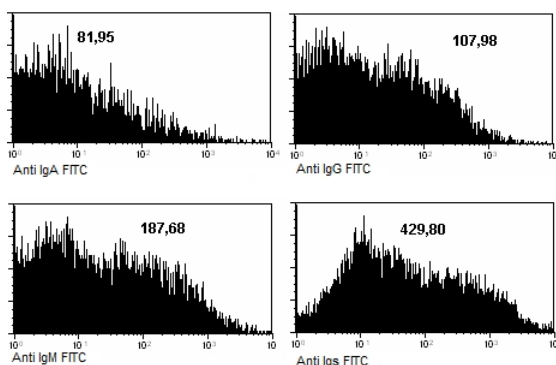


Figura 3. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan una muestra de trombocitopenia inmune. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Los anticuerpos anti-IgA y anti-IgM pueden producir un marcaje inespecífico en la IgG. En caso de que la muestra sea positiva para IgG, IgA e IgM, considere únicamente el primer
 2. La incubación del anticuerpo con las células en condiciones distintas a los procedimientos recomendados puede dar lugar a una reducción o pérdida de determinantes antigénicos de la superficie celular.
 3. Los valores obtenidos en individuos normales pueden variar de un laboratorio a otro; por lo tanto, se sugiere que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia normal.
 4. Las
- presentar una densidad de antígenos mayor que las células normales. En algunos casos, esto podría requerir el uso de una cantidad mayor de anticuerpo monoclonal que la indicada en los procedimientos de preparación de muestras.

4. En las muestras de sangre total, los glóbulos rojos presentes en muestras anormales, así como los glóbulos rojos nucleados (tanto de muestras normales como anormales), pueden ser resistentes a la lisis. Puede ser necesario prolongar los periodos de lisis de los glóbulos rojos para evitar la inclusión de células no lisadas en la región de selección de linfocitos.
5. Las muestras de sangre no deben refrigerarse durante un periodo prolongado (más de 24 horas), ya que el número de células viables disminuirá gradualmente, lo que podría afectar al análisis. Para obtener los mejores resultados, deben mantenerse a temperatura ambiente inmediatamente antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal.
6. Los resultados precisos de la e a con flow citometría dependen de la correcta alineación y calibración de los láseres, así como de los ajustes correctos de las puertas.

VALORES DE REFERENCIA

Los resultados anormales en el porcentaje de células que expresan el antígeno o en sus niveles de expresión pueden deberse a afecciones patológicas. Es recomendable conocer los patrones normales de expresión del antígeno para garantizar una interpretación adecuada de los resultados^(4,5,6).

Porcentaje en sangre periférica de un paciente normal: recuento de glóbulos rojos: 3,8 - $5,6 \times 10^6 / \mu\text{L}$

Plaquetas: 150 - $450 \times 10^3 / \mu\text{L}$

Los valores obtenidos en individuos sanos pueden variar de un laboratorio a otro; por lo tanto, se sugiere que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia normal.

CARACTERÍSTICAS

Valores de la fluorescencia verde de trombocitos teñidos de individuos sanos. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

Anticuerpo	Verde Fluorescencia (mediana)	Máximo Valor	Mínimo Valor	N
IgA antihumana	29,05	99,74	5,45	17
IgG antihumana	11,72	72,34	4,43	17
Anti-IgM IgM	13,89	68,11	5,25	17
Inmunoglobulina antihumana	12,37	65,91	3,98	17

Valores de la fluorescencia verde de los trombocitos teñidos de una muestra patológica individual.

Anticuerpo	Fluorescencia verde (mediana)	Valor máximo	Valor mínimo	N
Anti-IgA humana	144,63	446,30	23,53	15
IgG antihumana	62,58	457,07	13,83	15
IgM antihumana	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 Ig antihumanas con perlas de poliestireno recubiertas de inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM, así como con BSA (control).

El análisis de especificidad de las Ig antihumanas muestra una reactividad cruzada muy baja (>7 %) para todas ellas (fig. 4), lo que facilita la identificación correcta de las muestras no patológicas.

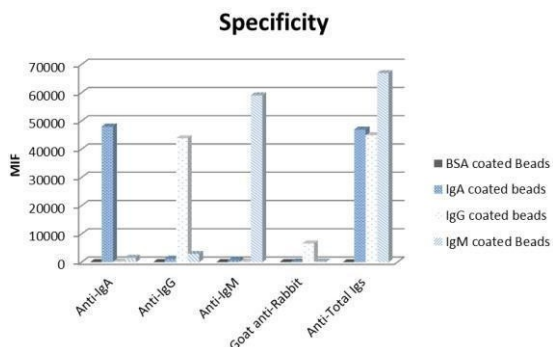


Figura 4: Las perlas de poliestireno recubiertas con inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM y BSA (control) se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSARIA II (Becton Dickinson, San José, CA).

GARANTÍA

Se garantiza únicamente que se ajusta a la cantidad y al contenido indicados en la etiqueta o en el etiquetado del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia por la presente a cualquier otra garantía. La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

1. Procedimientos para la obtención de muestras de sangre con fines diagnósticos mediante punción venosa: norma aprobada; quinta edición (2003). Wayne, Pensilvania: Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico; documento H3-A5.
2. «Procedimientos estándar para la obtención de muestras de sangre con fines diagnósticos», publicado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS)
3. Kotylo PK et al. Rangos de referencia para subconjuntos de linfocitos en pacientes pediátricos. Am J Clin Pathol 100:III-5 (1993)
4. Reichert et al. Rangos de referencia de subconjuntos linfocitarios en adultos caucásicos. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
5. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al., ed. Tipificación leucocitaria V: Antígenos de diferenciación de glóbulos blancos. Nueva York: Oxford University Press; 1995.
6. CLSI EPO9-A3. Comparación de procedimientos de medición y estimación del sesgo utilizando muestras de pacientes; Directriz aprobada - Tercera edición.
7. Rosenfeld, C.S. et al. Medición por citometría de flujo de anticuerpos antiplaquetarios. Am J Clin Pathol 1987, 87: 5841-522.
8. Ault K.A. Medición por citometría de flujo de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas. 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