

Kit de pruebas de compatibilidad cruzada para trasplantes (XMStep)

Referencia	Prueba	RUO
FCXM	100 test	

Reactividad: Humana

Origen: Sobrenadante procedente de un cultivo celular *in vitro* de un hibridoma celular.

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpos monoclonales de ratón anti-humanos conjugados con fluorocromos en una solución acuosa que contiene proteína estabilizadora y azida sódica al 0,09 % (NaNS).

Referencia	Reactivo suministrado	Clon	Isotipo	Fluorocromo
FCXM	Anti-IgG 5 µl/test (0,5 ml)	iMHP6017	IgG2a de ratón	FITC

USO RECOMENDADO

El kit de prueba de compatibilidad para trasplantes de Immunostep está destinado a determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados en el suero de un paciente contra los linfocitos de un posible donante mediante citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son un conjunto de moléculas que se encuentran en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo, así como en los glóbulos blancos. Cuando dos personas comparten el mismo HLA, se dice que son «compatibles», es decir, que sus tejidos son inmunológicamente compatibles entre sí.

La presencia de anticuerpos del receptor contra los antígenos expresados en los glóbulos blancos del donante es un factor de riesgo importante de rechazo precoz o pérdida del injerto tras un trasplante renal.¹ En este sentido, está indicado el estudio de compatibilidad cruzada HLA entre las células del donante y el suero del receptor antes del trasplante.

El análisis de anticuerpos específicos contra linfocitos B y T mediante citometría de flujo permite a los médicos realizar pruebas de compatibilidad cruzada para trasplantes mediante la detección de anticuerpos específicos para HLA de clase I y clase II, así como para otros antígenos también expresados en estas células.²⁻⁴ De este modo, una prueba de compatibilidad cruzada negativa justificaba proceder con el trasplante, mientras que una prueba positiva se consideraba una contraindicación para el trasplante renal.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

El anticuerpo monoclonal anti-IgG reconoce los anticuerpos anti-donante contra los linfocitos T (anticuerpos anti-HLA de clase I) y los linfocitos B (anticuerpos anti-HLA de clase I y/o de clase II) en la superficie de las células del donante.

Para identificar estos anticuerpos, las células se incuban con el suero del paciente y el anticuerpo anti-IgG. La muestra se analiza mediante citometría de flujo.

INDICACIONES ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Almacenar en la oscuridad, refrigerado 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 indicio 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.
- Las desviaciones del procedimiento recomendado podrían invalidar los resultados del análisis.
- SOLO PARA USO EN INVESTIGACIÓN.
- Solo para uso profesional.
- Antes de obtener las muestras, es necesario asegurarse de que el citómetro de flujo esté calibrado y compensado.

TOMA DE MUESTRAS

La extracción de muestras de sangre venosa debe realizarse en tubos de recogida de sangre utilizando el anticoagulante adecuado (se puede utilizar heparina, EDTA, citrato ácido-dextrosa (ACD) y citrato-fosfato-dextrosa (CPD))^{1,2}. Para obtener resultados óptimos, la muestra debe procesarse en las seis horas siguientes a la extracción. Las muestras que no puedan procesarse en las 72 horas siguientes a la extracción deben desecharse.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA

Aísle las células donantes mediante centrifugación en gradiente de densidad con FICOLL™ o cualquier otro medio o método que permita la separación de células mononucleares³⁻⁵.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Suero de control negativo.
- Suero de control positivo.
- Muestra de suero del receptor.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Planifique las siguientes muestras para la detección de IgG:

- Suero de control negativo.
- Suero de control positivo.
- Muestra de suero del receptor.

1. Resuspender y ajustar las células previamente aisladas a 3×10^6 células/ml en PBS.
2. Divida las células aisladas de la siguiente manera entre los 12 tubos de citómetro de 75 mm para el análisis:

- Tubo 1: 200 μ l de suspensión celular + 40 μ l de suero de control negativo.
- Tubo 2: 200 μ l de suspensión celular + 40 μ l de suero de control positivo.
- Tubo 3: 200 μ l de suspensión celular + 40 μ l de suero del receptor sin diluir.

3. Incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
4. Lave dos veces añadiendo 2 ml de PBS, mezcle en el vórtex y centrifugue a 540 g durante siete minutos; a continuación, retire con cuidado el sobrenadante por succión para no tocar el sedimento celular.
5. Añada el volumen recomendado del vial a cada tubo.
6. Incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
7. Lave una vez añadiendo 2 ml de PBS, mezcle en el vórtex y centrifugue a 540 g durante siete minutos; a continuación, retire con cuidado el sobrenadante por succión para no tocar el sedimento celular.
8. Resuspender el sedimento en 500 μ l de PBS

Analizar en un citómetro de flujo o almacenar en la oscuridad a 2 °C

-8 °C hasta que se realice el análisis

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se utilizará un citómetro de adquisición de datos de protocolo general. Los ajustes y puertas específicos que deben utilizarse para la citometría de flujo vienen determinados por el instrumento y deben ser decididos por el usuario final.

A continuación se muestran histogramas representativos de citometría de flujo de linfocitos marcados aplicando el protocolo descrito en el punto 7:

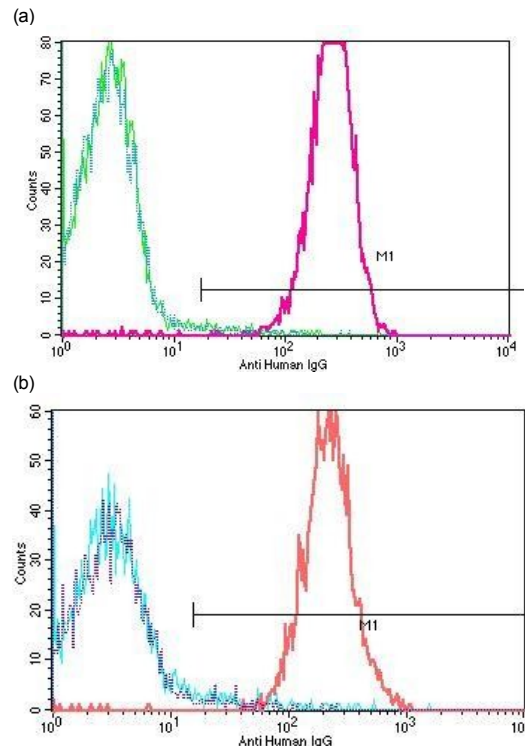


Fig. 1: Histograma superpuesto representativo de citometría de flujo de IgG en linfocitos. (a) Linfocitos B de sangre periférica humana con suero de control positivo (rosa), suero de control negativo (verde) y suero de receptor negativo (azul). (b) Linfocitos T de sangre periférica humana con suero de control positivo (rojo), suero de control negativo (azul) y suero de receptor negativo (violeta).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Debido al riesgo de obtener resultados negativos en sueros con niveles elevados de anticuerpos, se recomienda procesar un tubo adicional con suero diluido o introducir en el protocolo un paso de lavado adicional tras la incubación de los sueros, para evitar que las inmunoglobulinas libres del suero puedan reducir la tinción específica.

La precisión de los resultados con procedimientos de citometría de flujo depende de la correcta alineación y calibración de los láseres, así como de la configuración adecuada de los gates.

VALORES DE REFERENCIA

Se debe utilizar un suero de control negativo conocido y bien caracterizado para establecer los valores de referencia de FL1. Un suero de control positivo debe proporcionar una referencia para la tinción positiva en comparación con el control negativo.

Cada laboratorio establece sus propios valores de referencia. Por ejemplo: la prueba es positiva cuando el valor medio de fluorescencia sérica del receptor supera 3 veces el valor del control negativo.

GARANTÍA

Los productos Immunostep están garantizados en cuanto a la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep excluye cualquier otra garantía. Responsabilidad por

de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

1. Rechazo «hiperagudo» de un homoinjerto renal en el ser humano. Williams, G.M., Hume, D.M., Hudson Jr., R.P., Morris, P.J., Kano, K., Milgrom, F. (1968) New England Journal of Medicine, 279 (12), pp. 611-618.
2. Compatibilidad cruzada mediante citometría de flujo en el trasplante renal de cadáver humano. Iwaki Y, Cook DJ, Terasaki PI, Lau M, Terashita GY, Danovitch G, Fine R, Ettenger R, Mendez R, Kavalich A, et al. Nephron. 1991;57(3):268-72.
3. Validez de la citometría de flujo para la evaluación de la compatibilidad cruzada en el trasplante renal clínico. Stefoni S1, Nanni-Costa A, Buscaroli A, Borgnino LC, Iannelli S, Raimondi C, Scolari MP, Feliciangeli G, Bonomini V. Nephron. 1991;57(3):268-72.
4. Prueba de compatibilidad cruzada por citometría de flujo con resultado positivo solo en células B: implicaciones para el trasplante renal. Delgado JC, Eckels DD. Exp Mol Pathol. Agosto de 2008; 85(1):59-63. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.009. Publicación electrónica: abril de 2008 10.
5. 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.
6. «Procedimientos estándar para la obtención de muestras de sangre con fines diagnósticos», publicado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS)
7. Boyum, A. Aislamiento de células mononucleares y granulocitos de sangre humana. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suplemento 97 (Artículo IV), 77-89, 1968.
8. Ting, A. y Morris, P.J. Una técnica para la preparación de linfocitos a partir de sangre heparinizada almacenada. Vox. Sang. 20:561-563, 1971.
9. Fotino, M., Merson, E.J. y Allen, F.H. Micrométodo para la separación rápida de linfocitos de la sangre periférica. Ann. Clin. Lab. Sci. 1:131-133, 1971.

FABRICADO POR



Immunostep, S.L
Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Centro de Investigación Oncológica
(CIC) Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca (España)
Tel. (+34) 923 294 827
www.immunostep.com