

ThromboStep (2.ª generación): kit de detección de inmunoglobulinas asociadas a las plaquetas (kit PAIg)

REF

TBS-X-50T

50 test

RUO

INTRODUCCION

El recuento fisiológico de plaquetas suele oscilar entre 150 000 y 450 000 plaquetas por microlitro (µL) de sangre periférica en personas sanas. La trombocitopenia se define clínicamente como una reducción significativa del recuento de plaquetas circulantes. Dado que una disminución del recuento de plaquetas puede deberse a diversos procesos fisiopatológicos, la cuantificación de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas (PAIg) constituye una herramienta diagnóstica fundamental para diferenciar si la trombocitopenia se debe a una alteración en la producción de plaquetas o a una destrucción periférica acelerada.

MATERIALES PROPORCIONADOS

ThromboStep incluye los siguientes componentes, suficientes para realizar 50 determinaciones:

- Reactivo para la identificación de plaquetas: 1 vial de anticuerpo monoclonal anti-CD42a marcado con PE (clon validado para citometría de flujo; reconoce una glicoproteína de membrana integral de cadena única de 17–22 kDa, también conocida como GPIX, expresada en plaquetas y megacariocitos).
- Reactivos para la detección de inmunoglobulinas:
 - 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC dirigido contra las inmunoglobulinas humanas totales (Anti-Ig totales FITC).
 - 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC contra la IgA humana.
 - 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC contra la IgG humana.
 - 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC contra la IgM humana.
- Reactivo de control: 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC contra inmunoglobulinas totales de conejo (anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo FITC).
- Componentes del tampón:
 - 2 frascos de solución de Tyrode (sin bicarbonato sódico), concentrada 20 veces (2 x 50 ml).
 - 2 frascos de bicarbonato sódico (en polvo).
 - 1 frasco de solución de oxalato de amonio (en polvo).

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos de extracción de sangre que contengan EDTA como anticoagulante.
- Tubos de centrifuga de poliestireno o polipropileno de 12 x 75 mm.
- Solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 1 % en PBS.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- Agua destilada o desionizada.
- Micropipetas calibradas y puntas desechables.
- Mezclador de vórtex.
- Centrifuga equipada con un rotor oscilante.
- Citómetro de flujo equipado con láseres de excitación adecuados (488 nm) y canales de detección de fluorescencia (FITC/FL1 y PE/FL2).

USO PREVISTO / USO RECOMENDADO (versión RUO)

ThromboStep™ (Ref. TBS-X-50T) es un kit de reactivos destinado exclusivamente a la investigación, diseñado para la detección simultánea y el perfilado de inmunoglobulinas asociadas a las plaquetas (PAIg: IgG, IgA e IgM) en muestras de sangre periférica humana mediante citometría de flujo multicolor.

Este ensayo se ha desarrollado específicamente para apoyar las investigaciones sobre el inmunofenotipado plaquetario, facilitando la caracterización de los mecanismos plaquetarios mediados por anticuerpos frente a otros procesos que afectan a la homeostasis plaquetaria. El reactivo está optimizado para la tinción por inmunofluorescencia directa de plaquetas de sangre humana y está destinado a aplicaciones de investigación en laboratorio por parte de personal técnico cualificado. Solo para uso en investigación. No debe utilizarse en procedimientos diagnósticos ni terapéuticos.

RELEVANCIA CLÍNICA

La púrpura trombocitopénica inmune (PTI) es una enfermedad autoinmune caracterizada por un recuento bajo de plaquetas y hemorragias mucocutáneas. Los autoanticuerpos se dirigen principalmente contra los receptores específicos de las plaquetas CD41a (GPIIb/IIIa) y CD42b (GPIb). Como consecuencia, las plaquetas sensibilizadas son eliminadas rápidamente por el sistema de monocitos y macrófagos.La determinación de los autoanticuerpos contra las plaquetas permite diferenciar la trombocitopenia inmunitaria de la no inmunitaria.

CONDICIONES ADECUADAS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Conservar en un lugar oscuro, en el frigorífico 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.

INDICIOS DE DETERIORO

No se deben utilizar los reactivos si se observan signos visuales o físicos de deterioro o contaminación. El aspecto normal de los componentes líquidos es el de una solución transparente, incolora e inodora. La presencia de turbidez visible, crecimiento microbiano, decoloración o precipitación indica que el producto se ha deteriorado, por lo que el reactivo afectado debe desecharse inmediatamente. En caso de sospecha de degradación del reactivo, suspenda el análisis y póngase en contacto directamente con el Departamento de Asistencia Técnica de Immunostep en: tech@immunostep.com.

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

- a) 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 que se formen depósitos en las tuberías, donde podrían producirse situaciones explosivas. La ficha de datos de seguridad (FDS) está disponible en línea en www.immunostep.com
- b) Evita la contaminación microbiana del reactivo.
- c) Proteger de la luz. Utilizar luz tenue durante la manipulación, la incubación con células y antes del análisis.
- d) Nunca pipetee con la boca.
- e) En caso de contacto con la piel, lavar con abundante agua.
- f) Las muestras deben manipularse de la misma forma que aquellas capaces de transmitir infecciones. Deben garantizarse los procedimientos de manipulación adecuados.
- g) No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en el vial.
- h) Cualquier desviación del procedimiento recomendado podría invalidar los resultados del análisis.
- i) PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.
- j) Solo para uso profesional.
- k) 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. Mide 450 ml de H₂O con un cilindro graduado.
2. Vierte el H₂O en un vaso de precipitados limpio.
3. Añade todo el contenido del frasco de solución de oxalato de amonio (en polvo).
4. Mezcla suavemente hasta que se disuelva por completo y la solución sea homogénea.
5. Ajusta el volumen final a 500 ml con agua y mezcla bien.
6. Filtra a través de una membrana de 0,45 µm en un frasco adecuado y anota la fecha de preparación.

Nota: Una vez preparada, la solución de trabajo de oxalato de amonio IX se mantiene estable hasta un año si se conserva a temperatura ambiente (15–25 °C) en un recipiente bien cerrado.

PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE TAMPÓN DE TYRODE COMPLETO IX

1. Mide 950 ml de agua destilada o desionizada utilizando un cilindro graduado.
2. Vierte el agua destilada del cilindro graduado en un vaso de precipitados limpio y del tamaño adecuado.
3. Añade cuantitativamente al vaso de precipitados el contenido de 50 ml de un frasco de solución de Tyrode concentrada 20X.
4. Incorpore el bicarbonato sódico de un vial específico a la mezcla y agite o remueva continuamente hasta que el polvo se haya disuelto por completo.
5. Filtre la solución completamente homogeneizada a través de un filtro de membrana estéril de 0,45 µm directamente en un recipiente de almacenamiento limpio de 1 L, y anote claramente la fecha de preparación en la etiqueta del frasco.

Nota: tras añadir bicarbonato sódico, la matriz completa del tampón de Tyrode IX se mantiene estable hasta 90 días si se conserva a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si observa turbidez o se produce contaminación microbiana.

TOMA DE MUESTRAS

1. Se extraen 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 personas sanas.

we know from
immunostep

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Resuspender el sedimento de plaquetas que aparece en el fondo del tubo tras el decantado en 5 ml de oxalato de amonio IX, incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. El oxalato de amonio es una solución hipotónica que permite lisar los glóbulos rojos adheridos a las plaquetas.
2. Tras la incubación, centrifugar las células a 900 x g durante 10 minutos, decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento de plaquetas en 3 ml de tampón de lavado.
3. Centrifugar las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos y decantar el sobrenadante. Lavar las plaquetas una vez más a 900 x g durante 10 minutos.
4. Resuspender las plaquetas lavadas en 3 ml de una solución al 1 % de paraformaldehído, 10 mM de EDTA y 0,5 % de BSA. Incubar durante 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 ajustar la concentración de plaquetas a ≤100 000 plaquetas/µl.
7. Por último, los tubos se almacenan 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 policlinales anti-conejo; inmunoglobulinas policlinales anti-humanas; IgA policlinales anti-humanas; IgG policlinales anti-humanas; IgM policlinales anti-humanas). Se recomienda realizar el marcaje de las plaquetas con anticuerpos en hielo. Prepara un baño de hielo.
2. Añada 50 µl de muestra de plaquetas o de control con inmunoglobulinas anti-humanas a cada tubo.
- Tubo de anticuerpos policlinales anti-conejo: añada 20 µl de anticuerpos policlinales anti-conejo marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlinales anti-Ig humanas: Añadir 20 µl de anticuerpos policlinales anti-Ig humanas marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlinales anti-IgA humanas: Añadir 20 µl de anticuerpos policlinales anti-IgA humanas marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlinales anti-IgG humana: Añadir 20 µl de anticuerpos policlinales anti-IgG humana marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlinales anti-IgM humana: Añadir 20 µl de anticuerpos policlinales anti-IgM humana marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
3. Agitar con el vórtex e incubar las muestras durante 30 minutos en un baño de hielo a oscuras.
4. Añadir 3 ml de tampón de lavado a cada tubo, mezclar las muestras y centrifugar las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos. Repetir 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 a la oscuridad a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

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

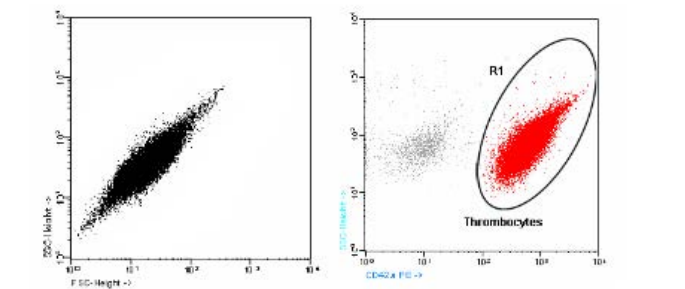


Figura 1. Las plaquetas de control (eventos rojos) son células que se encuentran dentro del filtro de CD42a (R1). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

A

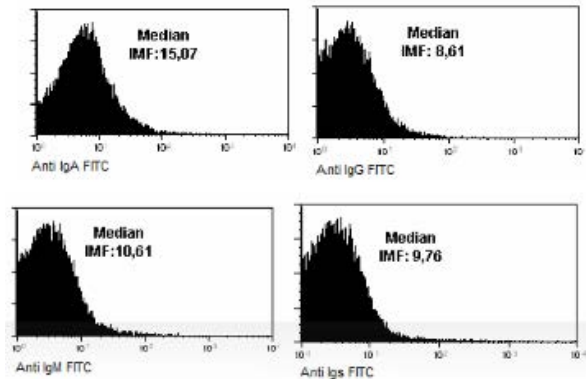


Figura 2. Trombocitopenia inmune. Los histogramas muestran la comparación entre una muestra de control sana (A) y una muestra de trombocitopenia inmune (B). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

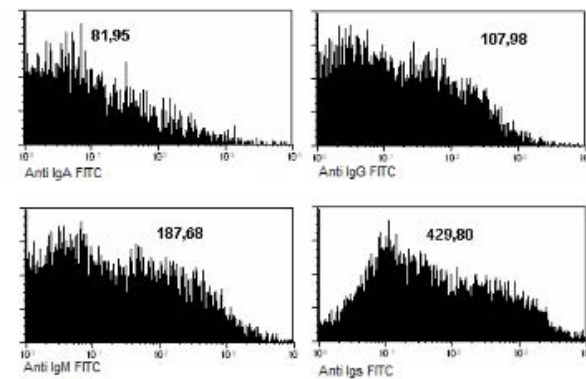


Figura 3. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan una muestra de trombocitopenia inmune. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los anticuerpos anti-IgA y anti-IgM pueden producir una marcación inespecífica en la IgG. En caso de que la muestra dé positivo para IgG, IgA e IgM, se tendrá en cuenta únicamente la primera.
- La incubación del anticuerpo con las células siguiendo procedimientos distintos a los recomendados puede provocar una reducción o pérdida de los determinantes antigénicos de la superficie celular.
- Los valores obtenidos en individuos sanos pueden variar de un laboratorio a otro; por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia normal.
- Las células o líneas celulares anormales pueden presentar una mayor densidad de antígenos que las células normales. En algunos casos, esto podría requerir el uso de una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal que la indicada en los procedimientos de preparación de muestras.
- 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 el tiempo de lisis de los glóbulos rojos para evitar la inclusión de células no lisadas en la región de selección de linfocitos.
- Las muestras de sangre no deben refrigerarse durante un período prolongado (más de 24 horas), ya que el número de células viables disminuirá gradualmente, lo que puede afectar al análisis. Para obtener los mejores resultados, deben mantenerse a temperatura ambiente inmediatamente antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal.
- La precisión de los resultados obtenidos mediante procedimientos de citometría de flujo depende de la correcta alineación y calibración de los láseres, así como de la configuración adecuada de los umbrales.

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

- Blood of a Normal Patient Red Blood Count : 3,8 - 5,6 X106/μL
- Platelets: 150 - 450 X103/μL

Los valores obtenidos en personas sanas pueden variar de un laboratorio a otro; por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia normal.

CARACTERÍSTICAS

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

Anticuerpo	Fluorescencia verde (mediana)	Valor max.	Valor min.	N
Anticuerpo IgA	29,05	99,74	5,45	17
Anticuerpo IgG	11,72	72,34	4,43	17
Anticuerpo IgM	13,89	68,11	5,25	17
Anticuerpo inmunoglobulina	12,37	65,91	3,98	17

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

Anticuerpo	Fluorescencia verde (mediana)	Valor max.	Valor min.	N
Anticuerpo IgA	144,63	446,30	23,53	15
Anticuerpo IgG	62,58	457,07	13,83	15
Anticuerpo IgM	83,54	258,44	20,85	15
Anticuerpo inmunoglobulina	91,49	272,37	17,38	14

ESPECIFICIDAD

Para el ensayo de especificidad del kit, se incubaron anticuerpos anti-Ig humanas con perlas de poliestireno recubiertas de inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM y con BSA (control), respectivamente. El análisis de especificidad de los anticuerpos anti-Ig humanas muestra una reactividad cruzada muy baja (>7 %) en todos los casos (fig. 4), lo que facilita la identificación correcta de las muestras no patológicas.

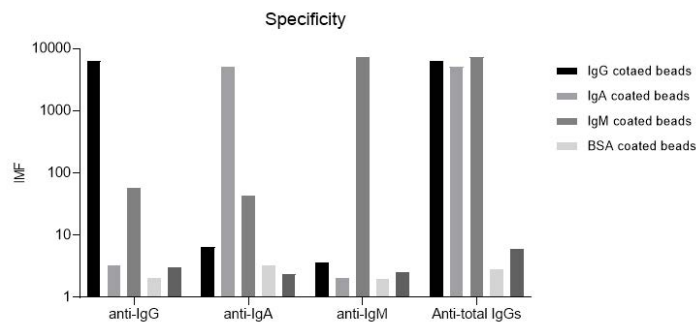


Figura 4: Se analizaron, mediante el citómetro de flujo FACSAria II (Becton Dickinson, San José, CA), perlas de poliestireno recubiertas con inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM y con BSA (control).

GARANTÍA

Se garantiza únicamente que el producto 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. Por la presente, Immunostep excluye cualquier otra garantía. La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard - Fifth Edition (2003). CLSI Document H3-A5. Wayne, PA.
- Kotlyo PK, et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol. 100:III-5 (1993).
- Reichert T, et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol. 60:190-208 (1991).
- Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. New York: Oxford University Press; 1995.

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	Form
	Referencia
	Contiene suficiente <n> test
	Cantidad por prueba
	Situación reglamentaria
	Uso exclusivo en investigación
	Fabricado

FABRICADO POR



Address: Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Cancer Research Center (C.I.C)
Campus de Unamuno
37007 Salamanca (Spain)
Telf./fax: (+34) 923 294 827
E-mail: info@immunostep.com
www.immunostep.com