

PROPÓSITO DE EMPLEO

PAK[®]12 es un ensayo cualitativo en fase sólida inmuno-enzimático (ELISA) para detectar anticuerpos a antígenos HLA clase I y a epítopes de glicoproteínas plaquetarias IIb/IIIa, Ia/IIa, y Ib/IX.

Para Uso en Diagnóstico *In Vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Muchos investigadores han descrito la existencia de antígenos plaquetarios específicos.^{1,2,3,4,5,6} Los anticuerpos a antígenos plaquetarios específicos o HLA clase I debidos a embarazo o transfusión pueden provocar la destrucción inmunológica de las plaquetas transfundidas.^{7,8,9} Confirmar la presencia de estos anticuerpos en el suero del paciente puede ser útil en la búsqueda de productos sanguíneos potencialmente compatibles.

PAK[®]12 microcubetas ELISA en Fase sólida contiene glicoproteínas IIb/IIIa y Ia/IIa de plaquetas capturadas monoclonalmente de donantes grupo O de tipos plaquetarios conocidos. HLA clase I y glicoproteína plaquetaria Ib/IX se suministran como glicoproteínas purificadas por afinidad. El test está diseñado para detectar y diferenciar entre anticuerpos HLA Clase I y antígenos específicos plaquetarios.

La configuración de los pocillos puede encontrarse en la Tabla de Resultados.

PRINCIPIO

Se añade suero o plasma de paciente microcubetas tapizadas con plaquetas y glicoproteínas HLA permitiendo, si estuviera presente, que el anticuerpo se enlace. Los anticuerpos no ligados se eliminan por lavado. Se añade a los pocillos un reactivo anti-inmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (Anti-IgG/A/M) y se incuba. La Anti-IgG/A/M no ligada se elimina por lavado y se añade el substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Tras un período de incubación de 30 minutos, se para la reacción añadiendo una solución de hidróxido sódico. Con un espectrofotómetro se mide la densidad óptica del color desarrollado.

REACTIVOS

Número máximo de test por kit: 5

Los reactivos deben conservarse según las instrucciones de la etiqueta.

- | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MS | 1. Microcubetas: tiras de microcubetas de fondo plano a las cuales se han inmovilizado plaquetas y glicoproteínas HLA. Las tiras de las microcubetas están dentro de la bolsa embalaje. Listo para el uso. |
| TCW | 2. Solución Concentrada de Lavado (10x): Solución tamponada de Tris (hidroximetil) aminometano conteniendo cloruro sódico y Tween 20. 1% azida sódica. Diluir con agua desionizada o destilada antes del uso. Almacenar la solución de trabajo de Lavado hasta 48 horas a temperatura ambiente o hasta siete días entre 2 y 8°C. |
| SD | 3. Diluyente de Muestra: Solución salina tamponada de Fosfato conteniendo albúmina bovina y suero de ratón. 0.1% azida sódica. Lista para el uso. |
| SB | 4. Tampón Substrato: Esta solución contiene dietanolamina y cloruro magnésico. 0.02% azida sódica. Listo para el uso. Proteger de la luz. |
| SS | 5. Solución de Paro: Hidróxido Sódico 3 M. Listo para el uso. Manipular con cuidado. |
| AH | 6. Conjugado: Anticuerpo de cabra a Inmunoglobulina Humana purificado por afinidad conjugado con Fosfatasa Alcalina (IgG/A/M). 0.1% azida sódica. Diluir con Diluyente de Muestra antes del uso. |

PN	7. PNPP (p-nitrofenil fosfato) Substrato: Polvo Cristalino. Reconstituir con agua desionizada o destilada y diluir en tampón de Substrato antes del uso. Proteger de la luz.
PC	8. Suero Control Positivo: Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar.
NC	9. Suero Control Negativo: Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar.
PS	10. Tapas para placas.

PRECAUCIONES

- No utilizar reactivos turbios o contaminados.
- SE DEBE tener cuidado de evitar la contaminación del Diluyente de Muestra y del Conjugado. La contaminación inadvertida de estos reactivos con suero humano o plasma provocaría la neutralización del Conjugado y el fallo de la prueba.
- No usar reactivos después de su fecha de caducidad.
- Las microcubetas y los reactivos contenidos en el kit no pueden usarse en otros kits de otros sistemas.
- La sustitución de los componentes suministrados en el kit por cualquier otro puede provocar resultados erróneos o inconsistentes.
- Después de cada serie de análisis desechar los restos no utilizados de Conjugado diluido, Controles positivo y negativo diluidos, y reactivo PNPP diluido y reconstituido.
- Seguir las instrucciones del fabricante de las pipetas en cuanto a aspiración y dispensación para la preparación correcta de las diluciones.
- La reacción Enzima substrato de la última incubación es sensible a la temperatura y debería realizarse entre 22 y 25°C.
- Puede ser necesario que el laboratorio establezca tiempos de incubación más largos o más cortos, debido a las variaciones en instrumentos o en la temperatura de la habitación para obtener resultados de controles consistentemente válidos. Debido a que la temperatura de la incubación final puede afectar a los valores de los controles, es importante monitorizar periódicamente la temperatura de la habitación.

CUIDADO

- Todos los sueros humanos utilizados en los Controles Positivo y Negativo para este producto han sido testados y encontrados negativos para los anticuerpos a HIV, HCV y HBsAg mediante métodos aprobados por la FDA. De todas formas ninguna prueba puede ofrecer completa seguridad de ausencia de virus de HIV, Hepatitis C, Hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por tanto, estos materiales deberían manipularse como potencialmente infecciosos.
- Algunos de los reactivos del kit contienen azida sódica como conservante.
ATENCIÓN: La azida sódica reacciona con las cañerías de cobre y plomo formando azidas metálicas latamente explosivas. Cuando se deseche en el fregadero deberá enjuagarse con gran cantidad de agua para prevenir el crecimiento de azidas. La azida sódica es un veneno y es tóxica si se ingiere.
- La solución de paro (NaOH) es corrosiva. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Las salpicaduras deberían lavarse inmediatamente.
- Al terminar desechar todos los componentes siguiendo la normativa local.

TOMA DE MUESTRA

La sangre se debe recolectar en ACD o EDTA (plasma) o sin anticoagulante (suero) utilizando la técnica aséptica y debería analizarse fresca lo antes posible para minimizar la posibilidad de obtener reacciones falsos positivos o falsos negativos debido al deficiente almacenaje o contaminación de la muestra. Las muestras que no puedan analizarse de forma inmediata deberían almacenarse a 2 y 8°C por no más de 48 horas o congelarlas. Las muestras congeladas a -20°C o inferior, permanecen en buenas condiciones por varios años (2-3 años). De todas formas, para evitar el efecto nocivo de repetidos ciclos descongelación/congelación, se recomienda alicuotar las muestras en pequeños volúmenes y conservarlas congeladas. Evitar los congeladores antiestancia.

Para almacenamiento o transporte, el suero o plasma debe ser separado de las células rojas.

Las partículas o agregados en la muestra pueden provocar falsos positivos o poca repetibilidad. Las muestras conteniendo partículas deberán aclararse por centrifugación antes de analizarlas.

Para este test solo puede usarse suero humano o plasma completo. La dilución previa de las muestras en cualquier forma no normal, suero humano negativo ELISA podría afectar al resultado.

Las muestras contaminadas por microorganismos, hemolizadas, lipémicas, ictéricas o inactivadas por calor pueden dar resultados inconsistentes y deberían evitarse.

PROCEDIMIENTO

Materiales Suministrados:

Los viales pueden contener más reactivo que el indicado en las etiquetas. Al preparar las soluciones, asegurarse de medir el reactivo con los instrumentos apropiados.

1. 6 – 2 x 8 Tiras de Microcubetas con soporte
2. 1 x 50 mL Soluc. Conc. Lavado
3. 1 x 14 mL Diluyente de Muestra
4. 1 x 14 mL Tampón Substrato
5. 1 x 14 mL Solución de Paro
6. 1 x 80 µL Conjugado Anti-IgG/A/M Humana
7. 3 x 50 mg PNPP Substrato
8. 1 x 0.3 mL Suero Control Positivo
9. 1 x 0.7 mL Suero Control Negativo
10. 6 Tapas para Placas

Material Necesario Adicionalmente:

1. Tubos para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos
2. Pipetas de transferencia
3. Micropipetas ajustables para dispensar 10 – 100 µL y 100 – 1,000 µL y puntas desechables
4. Cronómetro
5. Lector de microplacas capaz de medir DO a 405 o 410 y 490 nm
6. Agua desionizada o destilada
7. Toallitas papel absorbente
8. Lavador de microplacas o similar
9. Centrífuga capaz de separar suero o plasma de las muestras de paciente
10. Baño de agua de 37°C o incubador

Procedimiento del Test

1. Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.
2. Prepara la Solución de Lavado diluyendo el concentrado de lavado. Añadir 1 volumen de Concentrado de Lavado a 9 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
3. Determinar el número de muestras a testar. Utilizando la Tabla de Resultados, asignar a cada muestra una localización consistiendo de dos (duplicar) columnas. Registrar la identidad de cada muestra en la Tabla de Resultados.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES

4. Diluir como sigue y mezclar bien:

	Volumen Diluyente de Muestra	Volumen Muestra
PC	150 µL	50 µL
NC	600 µL	200 µL
Muestra Paciente	600 µL	200 µL

5. Sacar las microcubetas del marco de microcubetas de la bolsa. Sacar las microcubetas de la bolsa y rápidamente separar las tiras no necesarias y colocarlas en la bolsa protectora.

NOTA: Solo se suministra el marco con el kit. No desechar hasta haber utilizado todas las tiras.

NOTA: Orientar el marco con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Asegurarse de que todas las tiras están correctamente situadas y encajadas en el marco. Etiquetar o enumerar cada tira para evitar errores. Mantener la misma orientación de la placa durante todo el test.

6. Añadir 300 µL de Solución de Lavado de trabajo a todos los pocillos y dejar que alcance la temperatura ambiente en 5-10 minutos.

7. Aspirar o decantar vigorosamente e invertir sobre un papel absorbente para evitar que se seque.

8. Añadir 50 µL del control apropiado o muestra en las cubetas, tal como designe en la Tabla de Resultados.

NOTA: No añadir ni muestras ni reactivos a las cubetas de blanco.

NOTA: Si se analizan múltiples muestras de pacientes solo se necesita un solo set de controles. PARA EVITAR ERRORES MARCAR CADA UNA DE LAS TIRAS.

9. Sellar las microcubetas con una tapa para placas e incubar por 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. En caso de utilizar un incubador seco aumentar 10 minutos el tiempo de incubación.

10. Diluir el Conjugado 1 a 100 en Diluyente de Muestra. Utilizar un contenedor de polipropileno.

Tiras:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
AH	20 µL	60 µL
SD	2.0 mL	6.0 mL

NOTA: El conjugado es viscoso. Mojar la punta de pipeta 2-3 veces en el Conjugado antes de dispensar y enjuagar después de la adición al Diluyente de Muestra. Mezclar bien.

11. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 300 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

NOTA: Es importante eliminar completamente toda la solución de Lavado después del último lavado.

12. Añadir 50 µL de Conjugado diluido (preparado en el paso previo) a todos los pocillos EXCEPTO los designados como BLANCOS.

13. Sellar las microcubetas con una Tapa para placas e incubar 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. Si se usa un incubador seco debe aumentarse en 10 minutos el tiempo de incubación.

14. Disolver el Substrato PNPP añadiendo 0.5 mL de agua desionizada o destilada al vial. Volver a tapar y mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

15. Diluir el PNPP 1 a 100 en el Tampón de Substrato.

Tiras:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
PN	40 µL	120 µL
SB	4.0 mL	12.0 mL

Mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

16. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 300 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

Proceder rápidamente con los siguientes tres pasos.

17. Añadir 100 µL de la solución de PNPP diluida a todos los pocillos EXCEPTO aquellos designados como BLANCOS.

18. Dejar atemperar las microcubetas en oscuridad por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE (22 y 25°C).

NOTA: Después de la adición de PNPP el tiempo de incubación y la temperatura son críticos. NO VARIAR el tiempo de incubación establecido o la temperatura. Para mayor consistencia empezar a medir el tiempo después de la adición del reactivo a la primera cubeta.

19. Parar la reacción añadiendo 100 µL de Solución de Paro a cada pocillo en la misma secuencia que la adición del sustrato. Añadir 200 µL de Solución de Paro a los pocillos de blanco.

20. Leer la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 o 410 nm utilizando un filtro de referencia de 490 nm. Si no se puede leer el resultado inmediatamente, volver a poner los pocillos en oscuridad hasta un máximo de 30 minutos.

21. Restar los valores obtenidos en los pocillos BLANCOS a todos los de las muestras y controles. Muchos lectores de ELISA están programados para realizar este paso automáticamente.

22. Registrar los resultados en la Tabla de Resultados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control de calidad del PAK[®] 12 está integrado en el sistema por la inclusión de los Sueros Control Negativo y Positivo. Estos controles deben incluirse en cada serie para ayudar a determinar si se han producido errores técnicos o fallos del reactivo.

Criterios para un test válido:

	Control Negativo (IIb/IIIa filas)	Control Positivo
Media DO	≤ 0.175	≥ 1.000

Las lecturas de DO obtenidas de pruebas en duplicado deben quedar entre el 20% de la media de los dos valores. Las muestras cuyos resultados queden fuera de este límite deberán volver a determinarse.

NOTA: La pobre repetitividad de resultados se puede deber a omisiones de muestra o reactivo, desigual adición de reactivos, temperatura desigual durante las incubaciones, luz durante la incubación final o contaminación cruzada. El fallo en el test en duplicado puede conducir a aceptar resultados erróneos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados con valores de DO iguales o mayores que 2X el valor obtenido de la media de controles negativos de la correspondiente glicoproteína (2 valores de control negativo para cada glicoproteína). Se consideran resultados positivos.

LIMITACIONES

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana del material, períodos de incubación inadecuados, lavado o decantado inadecuado de los pocillos, exposición del sustrato a la luz, omisión de reactivos, exposición a temperaturas superiores o inferiores a las requeridas, u omisión de pasos.

La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas en la muestra del paciente puede provocar un aumento de uniones no específicas y producir falso-positivos en esta prueba.

Los resultados del test que no se ajustan a un patrón de especificidad de aloanticuerpos son considerados indeterminados. Estas muestras deben ser re-extraídas y/o re-testadas, o testadas por otro método diferente como pueda ser el GTI MACE[®] o el MAIPA.

Los resultados de este análisis no deberían usarse como única base para una decisión clínica.

Algunos anticuerpos de títulos bajos, baja avidéz pueden no detectarse utilizando este ensayo.

No deben detectarse anticuerpos a antígenos plaqueta-específicos que no estén representados en la Tabla de Resultados.

La presencia de otros antígenos plaqueta-específicos localizados en GPIIb/IIIa tales como HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) y HPA-8b (Sr^a) no se han determinado para las plaquetas capturadas en los pocillos GPIIb/IIIa . Es posible que aloanticuerpos a estos sistemas sean reactivos con esta prueba.

Usando este producto no deberían detectarse anticuerpos a antígenos HLA clase I de baja incidencia.

Por esta técnica se pueden detectar algunos anticuerpos HLA no-citotóxicos que no reaccionan en el ensayo de linfocitotoxicidad (LCA).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICO

Cuando se almacena adecuadamente y se utiliza de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, este producto puede detectar anticuerpos a antígenos HLA clase I y a antígenos plaquetarios específicos identificados en la Tabla de Resultados adjunta.

Para asegurar la adecuada reactividad y especificidad, cada lote de PAK[®]12 se analiza antes de comercializarlo con muestras conocidas que contienen anticuerpos que reaccionan con las glicoproteínas identificadas en la Tabla de Resultados adjunta así como con muestras conocidas que no contienen tales anticuerpos.

Evaluación de Rendimiento

		Método Comparativo		
		Positivo	Negativo	Total
PAK [®] 12	Positivo	97	5	102
	Negativo	13*	266	279
	Total	110	271	381

Acuerdo: 95.3%

Co-positividad: 88.2% Co-negatividad: 98.2%

Método Comparativo: RPHA= Ensayo de Hemoaglutinación pasiva Reversa

- * Puede dar resultados positivos con cualquier antígeno expresado en plaquetas, a causa de que el método comparativo incorpora plaquetas completas intactas como objetivo para la detección de anticuerpo.¹⁰ Los objetivos para la detección de anticuerpo en PAK[®]12 son las glicoproteínas individuales, y por tanto no detectará aglutininas frías o anticuerpos a antígenos de hematíes como Lewis.

REFERENCIAS

1. Kunicki TJ, Aster RH: Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen Pl(A1). Mol Immunol 1979; 16:353.
2. Van der Schoot, et al. Characterization of platelet-specific alloantigens by Immunoblotting: localization of Zw and Bak antigens. 1986. Brit. J. Haemat. 64:715-723.
3. Kuijpers, R. W. A. M. et al. Localization of the platelet-specific Ko-system antigen Ko^a/Ko^b in GP Ib/IX. 1989. Blood 74: Suppl. I, 226a.
4. Kieffer, N. et al. Immunochemical characterization of the platelet-specific alloantigen Lek^a, a comparative study with the Pl^{A1} alloantigen. 1984. Blood 64: 1212-1219.
5. Furihata, K. et al. On the association of platelet-specific alloantigen with glycoprotein IIIa. 1987. J. Clin. Invest. 80:1624-1630.
6. Kiefel, V. et al. The Br(a)/Br(b) alloantigen systems on platelets. 1989. Blood 73:2219-2223.
7. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunization to platelets. Transfusion 1978; 18:496.
8. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. Blood 1981; 57:395.
9. Schiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar on antigens on blood cells and body fluids. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980; 189-208.
10. Garratty G. Review: Platelet immunology – similarities and differences with red cell immunology, 1995. Immunohematology 11 No 4: 113-4.

U.S. Patent #5,514,557



GTi[®]DIAGNOSTICS

Good science starts with people.[™]

PAK[®]12

- PARA USO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- ALMACENAR A 2 y 8°C

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



REF PAK12

Rev. 2007-06-27 (S)

EC REP

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

www.gtidiagnostics.com