Instructions for use

Sanquin Reagents B.V.
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599
Fax: +31 20 5123570
Reagents@sanquin.nl
www.sanquin.org/reagents

MASPAT kit

REF K1360 IVD CE

053_v03 03-2022 (es)

Sólo para uso profesional

Ensayo en fase sólida para la detección de anticuerpos plaquetarios

Información general
El kit MASPAT (Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test) contiene microplacas MASPAT recubiertas (12 tiras de 8 pocillos), MASPAT LISS, MASPAT anti-IgG, MASPAT positive control y MASPAT negative control .
El kit MASPAT cumple con los requisitos de las normas y directrices correspondientes. Las características del funcionamiento se mencionan en el documento de venta, que es entregado junto con el producto a solicitud. El principio del análisis es la técnica en fase sólida, que se basa en la reacción de los antígenos/anticuerpos. Una monocapa de plaquetas de donante es inmovilizada mediante centrifugación en la superficie de los pocillos de microplaca recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón plaquetario específico. El suero del paciente y LISS (solución de baja fuerza iónica) son incubados en los pocillos apropiados, permitiendo que los anticuerpos del suero se unan a la monocapa inmovilizada de plaquetas. Después de la incubación, los componentes de suero que no se han unido se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos a las plaquetas son detectados añadiendo IgG anti-humano monoclonal de ratón y eritrocitos sensibilizados con IgG humano (MASPAT Indicator Red Cells) y la subsiguiente centrifugación de la microplaca. En caso de una reacción positiva, el IgG anti-humano y las MASPAT Indicator Red Cells se unen a los anticuerpos IgG en la monocapa de plaquetas. Por tanto, las reacciones positivas se caracterizan por la adherencia de las MASPAT Indicator Red Cells a toda la superficie de los pocillos, mientras que las reacciones negativas producen pellets discretos de MASPAT Indicator Red Cells en el centro del pocillo. Se recomienda encarecidamente la inclusión de MASPAT positive control y MASPAT negative control en cada serie de análisis.

Componentes del kit:

MASPAT Microplate (REF K1366): una microplaca con fondo U de 12 tiras de 8 pocillos. Todos los pocillos están recubiertos con anticuerpos monoclonales plaquetarios específicos. Almacenamiento a 2–8°C. La microplaca MASPAT se suministra en una bolsa de plástico cerrada al vacío con desecante. Después de extraerlos de la bolsa, los pocillos pueden usarse durante como máximo 4 semanas, siempre y cuando se almacenen a 2–8°C.

MASPAT LISS 10 mL (REF K1362): Solución de baja fuerza iónica.
Almacenamiento a 2–8°C.

MASPAT positive control 1 mL (REF K1363): contiene anticuerpos plaquetarios específicos. Almacenamiento a 2–8°C.

MASPAT negative control 1 mL (REF K1364): no contiene anticuerpos plaquetarios específicos.
Almacenamiento a 2–8°C.

MASPAT anti-IgG 6 mL (REF K1361): anticuerpo monoclonal de ratón específico para IgG humano (IgG1, IgG2, IgG3). Almacenamiento a 2–8°C.

Precauciones
Sólo para el uso diagnóstico in vitro. Se recomienda guardar los reactivos a 2–8°C. No usar los viales que pierden líquido o dañados. No usar los reactivos (abiertos o cerrados) después de la fecha de vencimiento, que aparece en la etiqueta del vial. NaN_3 0,1% (w/v) se usa como conservante. A pesar de que todos los productos sanguíneos han sido analizados para descartar enfermedades infecciosas, obteniéndose resultados negativos, no se puede garantizar que los reactivos estén libres de agentes infecciosos.
Usar y desechar cada recipiente y su contenido con cuidado. Un aspecto turbio puede ser señal de contaminación microbiana. Para reconocer el deterioro del reactivo, se recomienda analizar el reactivo como parte del programa de control de calidad del laboratorio, realizando los controles adecuados. La eliminación de residuos después de concluir el análisis, debe realizarse conforme a las regulaciones de su laboratorio.

Recogida y preparación de las muestras
Las muestras de suero deben obtenerse de sangre coagulada después de centrifugación a 1500 fcr durante 10 minutos. Si el análisis de las muestras de sangre se demora, conservar a <–18°C.
En el test pueden usarse concentrados de plaquetas (PC) o plasma rico en plaquetas (PRP). Para la preparación del PRP, se centrifuga la sangre completa en EDTA a 400 fcr durante 10 minutos. La fracción de PRP puede usarse directamente, sin diluir.

Procedimiento de análisis
Materiales requeridos pero no suministrados:
- Suspensión 0,3% de MASPAT Indicator Red Cells (REF K1139) de eritrocitos sensibilizados en un medio conservante.
- Pipeta multicanal apropiada para 50, 100 y 150 µL y puntas desechables.
- Salina tamponada con fosfato (PBS) y Tween 20.
- Depósitos para pipeta multicanal.
- Pipetas de transferencia desechables de PLÁSTICO.
- Centrífuga apropiada para microplacas.

- Incubadora 37°C.
- Centrífuga de microplaca.

Permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C).

1. Extraer la microplaca MASPAT con el número requerido de pocillos de microplaca de la bolsa. Los pocillos no usados pueden guardarse en la bolsa de plástico con el desecante.
2. Añadir 1 gota (50 µL) de PRP o PC del donante con una pipeta de transferencia **de plástico** a los pocillos requeridos (para suero de paciente, MASPAT positive control, MASPAT negative control). Se recomienda realizar el MASPAT positive- y MASPAT negative control con cada tira de ocho pocillos.
3. Centrifugar la microplaca durante 5 minutos a 50 fcr para inmovilizar las plaquetas en la superficie de los pocillos de microplaca **(sin frenado)**.
4. Trasvasar y eliminar las plaquetas que no se han unido lavando los pocillos de microplaca manualmente 3* veces con 150 µL de PBS/Tween 0,005%. La solución del lavado debe añadirse gota a gota usando una pipeta multicanal. Trasvasar PBS/Tween entre lavados invirtiendo y sacudiendo.
5. Añadir 2 gotas (100 µL) de MASPAT LISS a cada pocillo. El LISS es de color violeta.
6. Añadir 1 gota (50 µL) de MASPAT positive o negative control a los pocillos apropiados.
7. Añadir 1 gota (50 µL) del suero del paciente a los pocillos restantes con monoplacas de plaquetas de donante.
8. Centrifugar en una centrífuga de microplaca durante 10 segundos a 800 rpm (Sarstedt, TPM-2). El color violeta del LISS debe pasar a azul.
9. Incubar la microplaca a 37°C durante 30 minutos (cerrar la microplaca durante la incubación).
10. Trasvasar y lavar los pocillos de la microplaca manualmente 5* veces con 150 µL de PBS/Tween, como en paso 4.
11. Añadir 1 gota (50 µL) de MASPAT reactivo anti-IgG a cada pocillo inmediatamente después del lavado.
12. Añadir 1 gota (50 µL) de MASPAT Indicator Red Cells a cada pocillo. Agitar suavemente.
13. Centrifugar la microplaca a 200 fcr durante 5 minutos **(sin frenado)**.
14. Las reacciones pueden examinarse ahora macroscópicamente o usando un lector automático.
    *Si el lavado se realiza automáticamente, se recomienda validar los pasos de lavado.

Interpretación

Una reacción positiva o positiva débil (los eritrocitos forman una capa en el fondo del pocillo) indica la presencia de anticuerpos plaquetarios y/o HLA específicos en el suero.
Una reacción negativa (los eritrocitos forman un botón en el fondo del pocillo) indica la ausencia de anticuerpos plaquetarios y/o HLA específicos en el suero.

positiva positiva débil negativa

El MASPAT negative control debe realizarse para determinar los anticuerpos unidos a las plaquetas del donante.
Si se requiere un autocontrol del paciente, el suero del paciente debe ser analizado frente a las plaquetas del paciente mismo derivadas de una muestra de sangre con EDTA.

Aumentar la reactividad de las plaquetas: la congelación de las plaquetas del donante (PC o PRP) durante un mínimo de 30 minutos (<-18°C) aumentará su reactividad. Tras la congelación, las plaquetas pueden conservarse hasta 8 semanas.

Los PCs pueden ser diluidos con tampón de sequestrine.
Composición del tampón de sequestrine en solución de stock (10x concentrado):

- 0,175 M $Na_2HPO_4.2H_2O$
- 0,089 M $Na_2EDTA.2H_2O$ (Titriplex III)
- 1,54 M NaCl

Disolver en agua demi
pH: 6,8 - 7,0
El tampón de sequestrine 10x concentrado debe diluirse 1:10 en agua demi antes de su uso.
Almacenamiento a temperatura ambiente (18-25°C). Vida útil de la solución de stock: 1 año; solución de trabajo: 1 semana.

Limitaciones

La solución de lavado debe añadirse lentamente, visto que un lavado demasiado enérgico puede eliminar tanto las plaquetas que se han unido, como las que no se han unido. La superficie del pocillo es opaca cuando el procedimiento de lavado se ha realizado correctamente. "Agujeros" irregulares en la monocapa de plaquetas indican un procedimiento de lavado incorrecto. Si esto sucede, debe hacerse una nueva monocapa, usando nuevos pocillos de microplaca (pasos 3-5).
Los resultados falsos positivos o negativos pueden ser originados por contaminación del material de análisis o por diferir del método recomendado.
Los resultados falsos positivos pueden darse si las plaquetas del donante/paciente son ABO incompatibles con el suero analizado, si los anticuerpos IgG están unidos a las plaquetas del donante o si la concentración de plaquetas es demasiado baja ($<0,5 \times 10^8$/mL). Para probar si las plaquetas del donante tienen autoanticuerpos, se puede realizar la prueba con las plaquetas del donante y el control negativo o con las plaquetas del donante y el suero del donante.
Los resultados falsos negativos pueden darse con un MASPAT positive control si las plaquetas usadas no contienen los antígenos HPA-1a y HPA-3a.
Si la velocidad y el tiempo de centrifugación no ha sido optimizados, puede darse una adherencia deficiente de plaquetas a la microplaca.
Un recubrimiento subóptimo de los pocillos resultará en un funcionamiento inadecuado del test, reduciendo tanto la sensibilidad como la fuerza de las reacciones en los resultados finales del test.
El lavado insuficiente antes de añadir el reactivo MASPAT anti-IgG y/o las MASPAT Indicator Red Cells puede producir reacciones falsas negativas.
La centrifugación insuficiente de la microplaca después de añadir las MASPAT Indicator Red Cells puede producir resultados falsos positivos en todos los análisis (incluido el control negativo). Las reacciones falsas positivas pueden deberse al fracaso de resuspender correctamente las MASPAT Indicator Red Cells.

La centrifugación excesiva de la microplaca después de añadir las MASPAT Indicator Red Cells puede producir resultados falsos negativos en todos los análisis (incluido el control positivo).

Referencias

Lown, J.A., Ivey, J.G.: Evaluation of a solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. Department of Haematology, Royal Perth Hospital, Western Australia. (Transfus. Med. 1991).

Se garantiza que los productos Sanquin funcionarán tal como se describe en las instrucciones de uso del fabricante original. Es fundamental el cumplimiento estricto en relación a los procedimientos, los diseños de prueba y los reactivos y equipos recomendados. Sanquin rechaza toda responsabilidad que surja de cualquier desvío de ellos.