

Stem Cell Kit

Referencia	Test
SCK-25T	25 test
SCK-50T	50 test



Reactivo	Concentración (µg/ml)
CD45 FITC	25
CD34 PE	10
Control isotípico IgG1	10
7-AAD	45-65

INTRODUCCIÓN

“Stem Cell Kit” es un kit diseñado para la determinación cuantitativa de células madre hematopoyéticas (CMH) CD34 positivas gracias a la especificidad de los siguientes anticuerpos:

El anticuerpo anti-CD45 reconoce el receptor tipo C de la proteína tipo tirosina fosfatasa, una proteína de 220 kD miembro de la familia Antígeno Común Leucocitario.

El anti-CD34 reconoce la proteína CD34 antígeno celular progenitor hematopoiético, una glicoproteína monomérica de membrana tipo I de 110 kD presente en células precursoras hematopoyéticas inmaduras de la médula ósea¹⁸ y sangre, y en el endotelio de capilares sanguíneos^{15,16} de multitud de tejidos.

MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit incluye un vial de CD45/CD34, un vial de CD45/Control Isotípico IgG1, tubos de recuento, un vial de 7-AAD y una botella de solución de lisis IOX.

- A: CD45/CD34: Anticuerpos monoclonales de origen murino. El clon del CD45 es el H130. El clon del CD34 es el 581. El vial se presenta en una solución acuosa y contiene una proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica (NaN₃).
- B: CD45/Control isotípico IgG1: Anticuerpos monoclonales de origen murino. El clon del CD45 es el H130. El clon del control isotípico IgG1 es el B11/6.
- El vial se presenta en una solución acuosa y contiene una proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica.
- Tubos de recuento Stepcount: tubos para su uso en citometría que contiene un número conocido de microesferas de 4,2 µm de diámetro capaces de emitir fluorescencia (el número aparece en la etiqueta del tubo)
- 7-AAD: 7-Amino-Actinomicina en solución líquida y el 0,09% de azida sódica (NaN₃) para identificar las células no viables
- Solución de lisis X10: compuesta por Cloruro de Amonio (NH₄Cl) para lisar los eritrocitos y el 0,09% de azida sódica (NaN₃).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.

- Centrifuga
- Micropipetas capaces de dispensar volumen de entre 5 µl y 2 ml.
- Tubos de recolección de sangre con anticoagulante.
- Tampón de fosfato salino (PBS) con 0,09% de azida sódica. Es recomendable añadir BSA al 0,5%.
- Sistema de vacío
- Citómetro de flujo equipado con láser y filtros adecuados al fluorocromo.
- Agitador Vortex

USO PREVISTO.

El “Stem Cell Kit” de Immunostep ha sido diseñado para su uso en citometría de flujo, para la determinación del porcentaje y el recuento de las células CD34⁺/CD45⁺ discriminando entre células viables y células no viables. Adicionalmente, nos permite identificar el número de falsos positivos debidos al marcaje inespecífico gracias a la utilización del control isotípico del CD34.

Con este kit se pueden analizar cualquier tipo de muestra, incluyendo sangre, médula ósea, sangre movilizada, productos de leucoféresis, sangre de cordón umbilical¹¹.

RELEVANCIA CLÍNICA

El recuento de CMH CD34⁺ juega un papel muy relevante en el trasplante autólogo y alogénico son ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades hematológicas, tumores sólidos o desórdenes autoinmunes, debido a esto, la rápida reconstitución hematopoyética depende de la reinfusión de un número elevado de CMH.

PRINCIPIOS DEL TEST.

El kit permite identificar las células CD34⁺ y correlacionar su número con las esferas identificadas de número conocido, discriminando entre células viables y no viables y descartando los falsos positivos producidos por marcaje inespecífico del isotipo.

CONDICIONES DE AMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN ADECUADOS.

Guardar en oscuridad, refrigerado entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR. El anticuerpo es estable hasta la fecha que aparece en la etiqueta del vial si se almacena entre 2°-8° C. No usar después de esta fecha.

Una vez abiertos los viales de anticuerpos que componen el kit del producto son estables durante un periodo de 90 días.

EVIDENCIAS DE DETERIORO.

Los reactivos no deben ser utilizados si se encuentra alguna evidencia de deterioro. Para más información, contacte con nuestro servicio técnico tech@immunostep.com

Para los viales de anticuerpos, la apariencia normal es la de un líquido semi-transparente e inoloro. No deben aparecer precipitados ni presentar turbidez. No debe presentar olor.

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS.

- a) Los viales de los componentes del kit contienen azida sódica. Bajo condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazónico, un compuesto extremadamente tóxico. Los compuestos de azida deben ser disueltos con agua corriente antes de ser desechados. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde se podrían desarrollar condiciones explosivas. Ficha de datos de seguridad (FDS) disponible en la web www.immunostep.com
- b) Evitar contaminación microbiana del reactivo.
- c) Debe evitarse la exposición a la luz. Use luz tenue durante la manipulación, incubación con células y antes del análisis.
- d) No pipetear con la boca.
- e) En el caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.
- f) Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.
- g) No usar después de la fecha de caducidad establecida en el vial.
- h) Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis.
- i) PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- j) Sólo para uso profesional.
- k) Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.

RECOGIDA DE MUESTRAS.

La extracción de muestras debe hacerse en tubos de recolección adecuados, usando el anticoagulante apropiado (EDTA, ACD-A, CPD o heparina)^{2,3}. Para resultados óptimos, la muestra debe ser procesada durante las 6 horas posteriores a la extracción. Las muestras que no puedan ser procesadas en las 48 horas posteriores a la extracción deben ser descartadas.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

1. Es recomendable hacer un recuento de células totales antes de proceder al ensayo. Si el número de células es superior a 50×10^3 células/ul debemos hacer una dilución con PBS/BSA (ver materiales requeridos pero no suministrados) para que la concentración celular quede por debajo (recordar anotar la dilución).

2. Marcar dos tubos Stepcount como se describe a continuación:
 - Tubo N° 1: CD45/CD34/7-AAD
 - Tubo N° 2: CD45/Isotype Control/7-AAD
3. Añadir 20 µl de reactivo A: CD45 FITC / CD34 PE en el N°1 tubo. Pipetear 20 µl de reactivo B: CD45 FITC / control de isotipo PE en el N°2. No tocar el sedimento de esferas.
4. Añadir 5 µl de 7-AAD a cada uno de los tubos.
5. Añadir la muestra en cada tubo y mezclar adecuadamente en el vortex. El volumen recomendable es entre 20 y 100 µl (anotar el volumen).
6. Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C) durante 15 minutos o a 4° C durante 30 minutos.
7. Añadir 0,45 ml de la solución de lisis 1X de Cloruro de amonio (NH₄Cl) en cada tubo. Agitar en el vortex e incubar en oscuridad durante 10 minutos o hasta que la muestra esté lisada.

Adquirir en un citómetro de flujo o almacenar a 2-8° C en oscuridad hasta el análisis. Las muestras deben ser adquiridas durante la hora siguiente a la lisis.

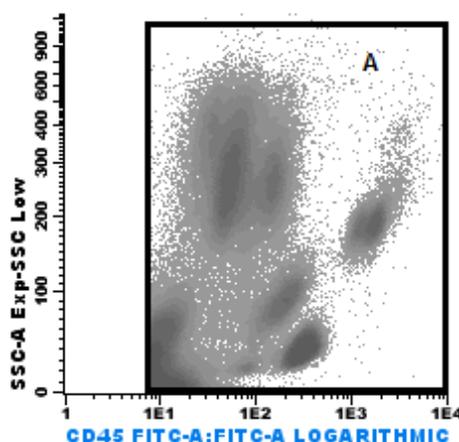
ADQUISICIÓN Y ANALISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Antes de adquirir las muestras, verificar que el citómetro está alineado correctamente y estandarizado para dispersión de luz. Los parámetros FSC y SSC deben estar fijados en la amplificación lineal mientras que la intensidad de fluorescencia (parámetros FL1, FL2, FL3 FL4...) deben ser ajustados en la amplificación logarítmica. La compensación de la fluorescencia se ha establecido siguiendo las instrucciones del fabricante del citómetro.

Antes de adquirir las muestras, ajustar al mínimo el umbral o discriminador en el parámetro FSC para minimizar los residuos y garantizar que la población de interés quedará incluida en el análisis.

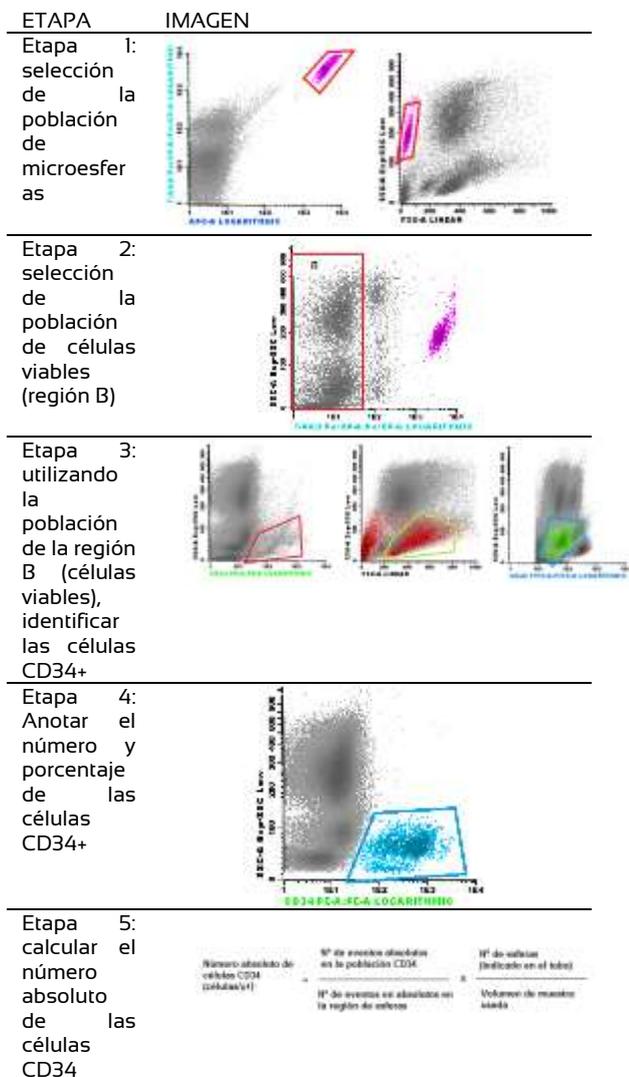
Antes de adquirir en el citómetro de flujo, se recomienda agitar manualmente y de manera suave las muestras para garantizar la resuspensión completa de las células y microesferas.

Establecer en el citómetro la región A tal y como se muestra en la imagen, para que sólo almacene los eventos de esta región durante la adquisición:



Adquirir y analizar toda la muestra posible del tubo. Es recomendable adquirir a velocidad baja o media para evitar la formación de agregados celulares. Si no se va a adquirir toda la muestra es recomendable parar cada 4 minutos, agitar el tubo manualmente y seguir con la adquisición.

Ejemplo de análisis:



El número absoluto de la población de células CD34+ se determinó dividiendo el número absoluto de células CD34+ adquiridos por el número de esferas adquiridas, y multiplicando este resultado por la concentración de microesferas (concentración de microesferas está indicado en la etiqueta de la tubo) partido por el volumen de muestra usada. Si hemos realizado alguna dilución, el número final debe ser multiplicado por la dilución llevada a cabo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La incubación de los anticuerpos con las células sin seguir los procedimientos recomendados puede concluir con una disminución o pérdida de los determinantes antigénicos de la superficie celular.
2. Los valores obtenidos de individuos normales pueden variar entre distintos laboratorios, por tanto,

se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.

3. Las células anómalas o las líneas celulares pueden mostrar una mayor densidad antigénica que las células normales. Esto podría requerir, en algunos casos, el uso de una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal de la que se indica en los procedimientos de preparación de la muestra.
4. En muestras de sangre completa, los eritrocitos encontrados en muestras patológicas, al igual que las células de la serie roja nucleadas (tanto de muestras normales como patológicas), pueden ser resistentes a la lisis. Se pueden necesitar tiempos más largos de lisis de eritrocitos para evitar la inclusión de las células no lisadas en la región delimitada de los leucocitos.
5. Las muestras de sangre no deberían refrigerarse por un periodo excesivo (más de 24 horas), ya que el número de células viables irá disminuyendo con el tiempo, pudiendo incluso interferir en el análisis. Para obtener mejores resultados, debería mantenerse a temperatura ambiente minutos antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal.
6. Los resultados más precisos con los procedimientos de citometría de flujo dependen de un alineamiento y calibración correctos de los láseres, al igual que del establecimiento de las regiones correctas.

VALORES DE REFERENCIA.

Resultados anormales en el porcentaje de células que expresen el antígeno o en los niveles de expresión de éste pueden ser debidos a estados patológicos. Es recomendable conocer los patrones normales de expresión del antígeno para poder hacer una interpretación adecuada de los resultados^{4,5,6}.

Los valores obtenidos de individuos sanos podrían variar entre distintos laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.

CARACTERÍSTICAS

ESPECIFICIDAD

Anti CD34 clon 581, se incluyó en el 5º Taller Internacionales sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos, código WS MA27⁶.

El anticuerpo anti-CD45 clon HI30 fue incluido en el 4º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código N8161¹².

INTERFERENTES

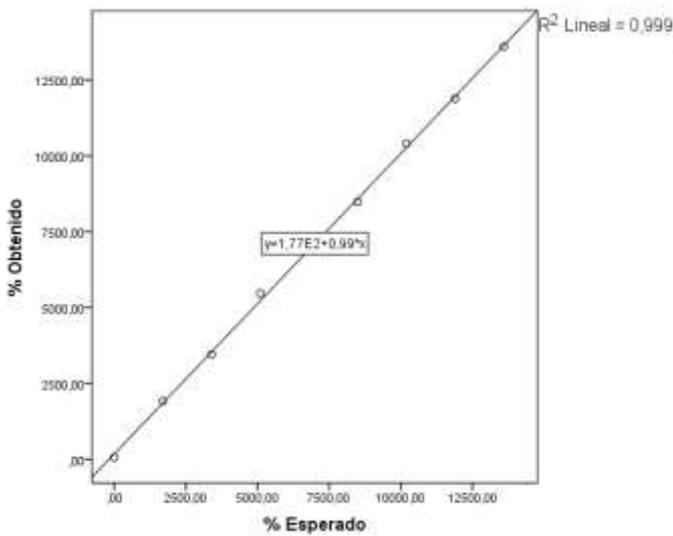
No deberían ser usadas muestras coaguladas, fijadas o con gran cantidad de hemolisis.

LINEARIDAD

Para el análisis de la linealidad se realizaron diferentes diluciones de una población positiva (células 293T transfectadas con CD34, ref. H34LYS) y una población negativa (células de la línea 293T sin transfectar) manteniendo el número total de células constante y se analizó la correlación entre los porcentajes esperados y los porcentajes obtenidos⁹.

Análisis estadístico

R	R cuadra do	Error típico de la estimación	Linea de regresión
1,000 a	,999	142,9315	Y= 0,990x + 176,71



Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

REPETIBILIDAD y PRECISIÓN ENTRE LABORATORIOS

La repetibilidad del Stem Cell Kit fue determinada analizando 3 muestras control comerciales con diferentes niveles de CMH de valores similares a sangre periférica normal (Low), médula ósea (Medium) y sangre de cordón o sangre movilizada (High), realizando análisis en dos laboratorios diferentes con diferentes equipos (FACS Calibur y FACS Aria II) y técnicos, durante un periodo de 20 días⁷.

* CD-Chex CD34, Streck

Los resultados obtenidos para cada laboratorio se muestran a continuación:

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
Resultado global (Overall result)	Low		Medium		High	
N	50		50		50	
Valor medio (Mean value)	0,067		0,895		2,851	
	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Interserial (Between-lab)	1,0079	13,43%	5,7253	9,67%	6,9357	3,85%
Interdia (Between-day)	0,3755	5,00%	2,5918	4,38%	1,4463	0,80%
Intra-laboratorio (Whitin-lab)	1,0755	14,33%	6,2846	10,61%	7,0849	3,93%

SD: Desviación Estándar

CV: Coeficiente de Variación

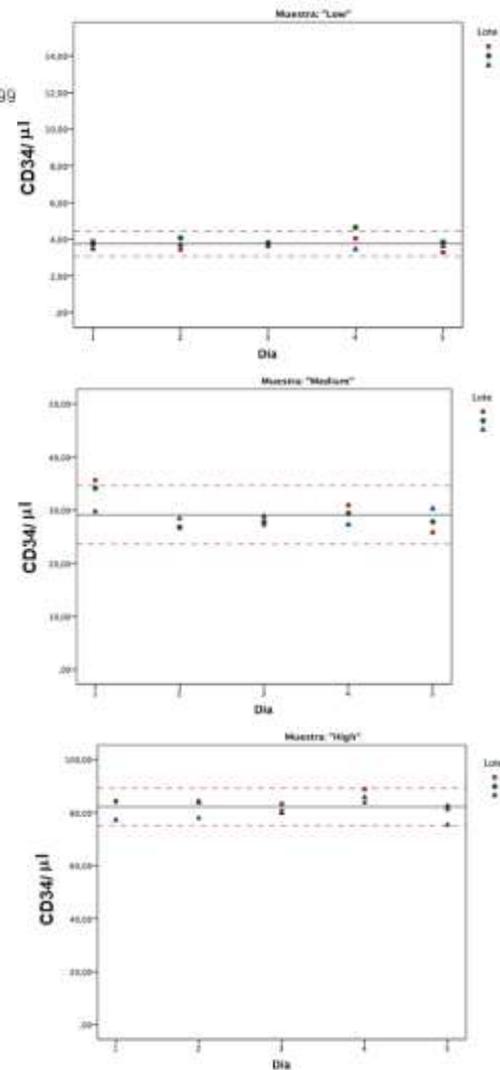
REPRODUCIBILIDAD ENTRE LOTES

Para demostrar la reproducibilidad entre lotes, se marcaron 3 muestras controles con diferentes niveles de CMH CD34*, de valores similares a sangre periférica

normal "Low", médula ósea "Medium*" y sangre de cordón o sangre movilizada "High*", realizando análisis con tres lotes diferentes durante 5 días no consecutivos⁷.

*CD-Chex CD34, Streck

A continuación se muestran los resultados para cada muestra:



El resultado del análisis aparece mostrado en el siguiente cuadro:

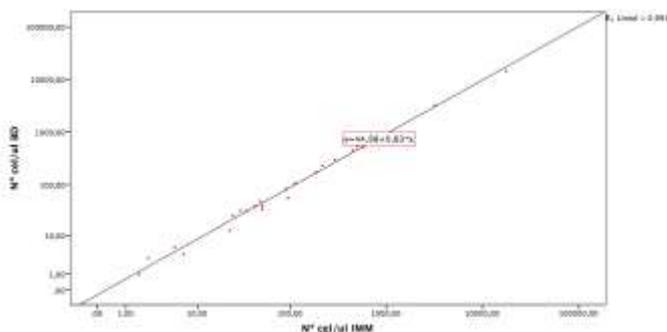
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
Resultado global (Overall result)	High		Medium		Low	
N	50		50		50	
Valor medio (Mean value)	0,067		0,895		2,851	
	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Interserial (Between-Bath)	4,4675	6,45%	5,7253	23,31%	0,3376	14,35%

COMPARACIÓN DEL SISTEMA DE MEDIDA

Para determinar la concordancia de los resultados se realizó una comparativa del procedimiento de medida⁹ con un kit de referencia* en muestras de médula ósea de pacientes sanos y enfermos, analizando el número absoluto de células CD34*.

La siguiente tabla muestra el análisis de los resultados y la exactitud del kit Stem Cell Kit de Immunostep con respecto del kit de referencia*, en un intervalo de confianza del 95% (IC) dividido por intervalos en: bajo >10, medio entre 10 y 100 y alto >100 células por microlitro.

A continuación representamos en forma de recta de regresión los datos obtenidos:



R	R cuadrado	Error típico de la estimación	Linea de regresión
0,999	,998	133,97930	Y= 0,83x + 44,98

Análisis estadístico

* Becton Dyckison BD™ Stem Cell Enumeration Kit
Catálogo No. 344563

GARANTIA

Los productos de Immunostep tienen garantía en cuanto a la cantidad y el contenido indicado en la etiqueta del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia a cualquier otra garantía. La responsabilidad de Immunostep se limita al remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture- approved standard; Fifthedition (2003). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H3-A5.
- Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
- Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
- Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
- Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, ed. Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. New York: Oxford University Press; 1995.
- CLSI EPO5-A3. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition.
- Evaluation of the Linearity of Quantitative measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline-Second Edition.
- CLSI EPO9-A3. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Third Edition.
- Concordant expression of class II and class III CD34 epitopes on haemopoietic cells in leukapheresis and cord blood samples with CD45/CD34 dual staining. Br J Haematol. 1997 May;97(2):488-91. Rudin CEI, Garland JM, Joyner MV.
- Sutherland DRI, Keating A, Nayar R, Anania S, Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. Exp Hematol. 1994 Sep;22(10):1003-10.
- Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al. 1989. Leucocyte Typing IV. Oxford University Press. New York.
- Sutherland, Keating, A, "The CD34 antigen: Structure, biology and potential clinical applications", 1992, J. Hematotherapy, 1, 115-129.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., Stratford, M., "CD34: Structure, biology and clinical utility", 1996, Blood, 1, 87, 1-13.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, d., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., Greaves, M.F., "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells", 1990, Blood, 75, 2417-2426.
- Delia, D., Lampugnani, M.G., Resnati, M., Dejana, E., Ajello, A., Fontanella, E., Soligo, D., Pierotti, M.A., Greaves, M.F., "CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro", 1993, Blood, 81, 1001-1008.
- Simmons, P.J., Torok-Storb, B., "CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow", 1991, Blood, 78, 2848-2853.

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