

# Anti-Humano CD11a (TP1/40)

Fluorocromo	Referencia	Test
PE	IIAPE-100T	100 test



## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Otros nombres:** Integrin alpha-L, CD11 antigen-like family member A, Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 alpha chain, LFA-1A, Leukocyte function-associated molecule 1 alpha chain.

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal anti-CD11a procede de células T activadas con PMA e Ionomicina (Humanas).

**Clon:** TP1/40

**Isotipo:** Ratón IgG1, kappa

**Reactividad:** Humano

**Fuente:** sobrenadante procedente de un cultivo celular in vitro de un hibridoma.

**Purificación:** cromatografía de afinidad.

**Composición:** anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano CD11a conjugado con fluorocromos en una matriz acuosa que contiene un estabilizante de proteínas y un 0.09% de azida sódica (NaN<sub>3</sub>).

Fluorocromo	Reactivo suministrado	Concentración (µg/ml)
PE (R-Phycoerythrin)	25 ug en 2 ml	12,5

## USO RECOMENDADO

El CD11a de Immunostep, clon TP1/40, es un anticuerpo monoclonal usado para el diagnóstico *in vitro* para la identificación y enumeración de muestras de linfocitos humanos que expresen CD11a usando citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLINICA

Este anticuerpo se puede utilizar en citometría de flujo para el análisis de muestras de sangre y médula ósea o inmunohistoquímica. El anticuerpo monoclonal está dirigido contra el antígeno CD11a, localizado en la cadena alfa L del complejo LFA-1 (Antígeno-1 asociado a función linfocitaria), que se expresa en linfocitos inmunocompetentes maduros y sus homólogos neoplásicos, todos los leucocitos incluyendo linfocitos B y Linfocitos T, monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Como función reconocida está la adhesión intercelular y la coestimulación. Los anticuerpos CD11a / CD18 bloquean las respuestas de las células T a las células presentadoras de antígenos (incluyendo la reacción de linfocitos mixtos), las células T ayudan a las células B, la matanza mediada por CTL y NK, la muerte de macrófagos de células tumorales y la adhesión / extravasación al endotelio de leucocitos.<sup>(6-10)</sup>

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD11a se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD11a. Para identificar estas células se incuban la muestra con el anticuerpo y se analiza en un Citómetro de flujo.

## 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 abierto el vial el producto es estable 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](mailto:tech@immunostep.com)

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.

- Los reactivos 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. La ficha de datos de seguridad (FDS) está disponible en la web [www.immunostep.com](http://www.immunostep.com)
- Evitar contaminación microbiana del reactivo.
- Debe evitarse la exposición a la luz. Use luz tenue durante la manipulación, incubación con células y antes del análisis.
- No pipetear con la boca.
- En el caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.
- Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.
- No usar después de la fecha de caducidad establecida en el vial.
- Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis.
- PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- Sólo para uso profesional.
- Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.

## RECOGIDA DE MUESTRAS.

La extracción de muestras de sangre venosa debe hacerse en tubos de recolección de sangre usando el anticoagulante apropiado (EDTA o heparina)<sup>1,2,3</sup>. 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.

### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Controles isotípicos:

Fluorocromo	Control isotípico	Referencia Immunostep
PE	Mouse IgG1	ICIGG1PE-50UG

- Centrifuga
- Tubos de ensayo para citometría de 12 x 75-mm
- Micropipetas para dispensar volúmenes de 5 µl a 2 ml
- Tubos recolectores de sangre con anticoagulante.
- Buffer fosfato salino (PBS) con 0.09% azida sódica. Es recomendable añadir un 0.5% de BSA.
- Sistema de vacío
- Solución de lisis
- Citómetro de flujo equipado con los láseres apropiados.
- Vortex Agitador

### PREPARACION DE LA MUESTRA:

1. Añadir el volumen recomendado en el vial del anticuerpo a un tubo de citometría 12x75 mm. Es recomendable preparar un tubo adicional con el control isotípico adecuado (*ver materiales requeridos pero no suministrados*)
2. Añadir 100 µL de muestra (hasta 10<sup>6</sup> células) y mezclar adecuadamente en el vortex.
3. Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C) durante 15 minutos o a 4° C durante 30 minutos.
4. Añadir 2 ml de la solución de lisis, agitar en el vortex e incubar en oscuridad durante 10 minutos o hasta que la muestra esté lisada.
5. Centrifugar a 540g durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante con cuidado de no tocar el pellet celular. Dejar unos 50 µl de líquido sin aspirar.
6. Resuspender el pellet.
7. Añadir 2 ml de PBS (*ver materiales requeridos pero no suministrados*)
8. Centrifugar a 540g durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante con cuidado de no tocar el pellet celular. Dejar unos 50 µl de líquido sin aspirar.
9. Resuspender el pellet en 0,3 ml de PBS.

Adquirir en un citómetro de flujo o almacenar a 2-8° C en oscuridad hasta el análisis. Las muestras deben ser adquiridas durante las 3 horas siguientes a la lisis.

## ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD11a y determinar el porcentaje de células marcadas.

Se debe usar un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que el CD11a para estimar y corregir la unión no específica de los linfocitos (*ver materiales requeridos pero no suministrados*). Generar una región de análisis para eliminar el ruido de fondo de la fluorescencia y para incluir las células marcadas correctamente. A continuación se muestra un ejemplo de representación del marcaje celular.

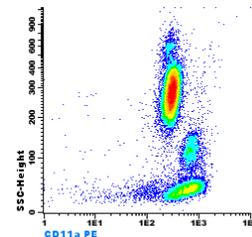


Fig. 1: diagram de la intensidad media de fluorescencia de la población de leucocitos CD11a+ y su complejidad interna (SSC) en una sangre periférica de un individuo sano.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La incubación del anticuerpo 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<sup>4,5</sup>.

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

**CARACTERISTICAS**

ESPECIFICIDAD

Se obtuvieron muestras de sangre de donantes caucásicos sanos con el anticuerpo monoclonal CD11a PE.

Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron para análisis. Las muestras de sangre se procesaron por un método de marcaje para leucocitos por inmunofluorescencia directa para análisis por citometría de flujo.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones celulares), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, se tiñeron con un control de isotipico adecuado y el MAb de estudio. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con el MAb mencionado. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Resumen casos			
	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
1	99,60	100,00	100,00
2	99,78	100,00	100,00
3	99,29	100,00	100,00
4	99,33	100,00	100,00
5	99,28	100,00	100,00
6	98,74	100,00	100,00
7	97,04	100,00	100,00
8	92,82	100,00	100,00
9	95,36	100,00	100,00
10	99,11	100,00	100,00
Total N	10	10	10
Media	98,0350	100,00	100,00
Mediana	99,1950	100,00	100,00
Minimo	92,82	100,00	100,00
Maximo	99,78	100,00	100,00
Desv. tip.	2,29228	,00000	,00000
Varianza	5,255	,000	,000

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD11a se determinó mediante el marcaje de una muestra de sangre del donante. Se realizaron diluciones de una muestra de sangre periférica para comprobar la escala de concentración de células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

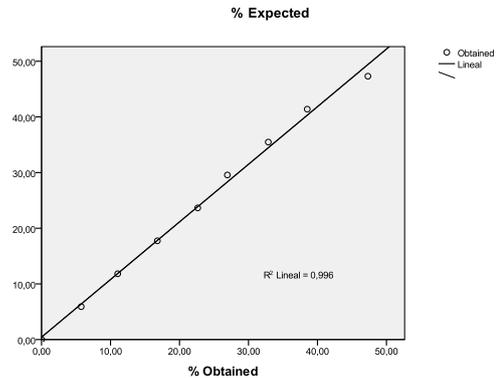
Determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado frente a pequeñas variaciones (pero deliberadas), proporciona una indicación de su

fiabilidad durante su uso normal. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Resumen casos				
	Muestra	Dilucion	% Esperados	% Obtenidos
1	400A + 0B	100,0	47,31	47,31
2	350A + 50B	87,5	41,39	38,52
3	300A + 100B	75,0	35,48	32,87
4	250A + 150B	62,5	29,57	26,94
5	200A + 200B	50,0	23,65	22,64
6	150A + 250B	37,5	17,74	16,79
7	100A + 300B	25,0	11,82	11,04
8	50A + 350B	12,5	5,91	5,75
9	0A + 400B	,0	,00	,00
Total	N 9	9	9	9

**Resumen modelo**

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustada	Error Std.
1	,998 <sup>a</sup>	,996	,995	1,11101
a.Predicho: % Obtenido				



REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad para el anticuerpo monoclonal conjugado CD11a PE de Immunostep se llevó a cabo realizando 10 determinaciones con 10 réplicas de cada anticuerpo para tres intervalos de CD11a +, alto, medio y bajo. Así, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada intervalo de CD11a. De esta manera, se demostró la reproducibilidad a lo largo de todo el rango de medición.

Las 10 determinaciones para cada intervalo se realizaron mediante tinción, procesamiento y análisis de las 10 muestras separadas. Los linfocitos se seleccionaron para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada uno de los tres intervalos.

Para realizar este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de un donante normal que expresaba un alto porcentaje de células CD11a +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando células CD11a conocidas en proporciones apropiadas, manteniendo la misma concentración total de células para los tres rangos.

El estudio se realizó en tres laboratorios independientes, de manera que cada laboratorio obtuvo, marcó y analizó muestras de sangre separadas.

#### Resumen datos

	% Altos	% Medios	% Bajos
1	78,24	66,21	57,26
2	79,34	65,72	56,07
3	79,14	65,50	55,92
4	78,32	65,55	54,45
5	77,85	65,88	56,72
6	78,83	64,80	55,71
7	78,49	64,48	57,60
8	79,13	65,68	59,00
9	78,52	63,12	56,38
10	77,18	64,81	57,05
Total N	10	10	10

#### Estadística descriptiva

	% Altos	% Medios	% Bajos
N	10	10	10
Validos			
Perdidos	0	0	0
Media	78,5040	65,1750	56,6160
Mediana	78,5050	65,5250	56,5500
Moda	77,18	63,12	54,45
Desv. tip.	,65712	,90348	1,23001
Varianza	,432	,816	1,513
Rango	2,16	3,09	4,55
Minimo	77,18	63,12	54,45
Maximo	79,34	66,21	59,00

\*Nota: Datos analizados con SPSS para Windows 17.0

#### 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

1. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture- approved standard; Fifth edition (2003). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H3-A5.
2. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
3. 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.

4. Kolylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
5. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
6. Sanchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ, et al. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. Proc Natl Acad Sci U S A 1982 Dec;79(23):7489-93.
7. Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3b complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. J Exp Med 1983 Dec 1;158(6):1785-803.
8. Kishimoto TK, Hollander N, Roberts TM, Anderson DC, Springer TA. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. Cell 1987 Jul 17;50(2):193-202.
9. Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. Annu Rev Immunol 1987;5:223-52.
10. Knapp W. Leucocyte typing IV: white cell differentiation antigens. Oxford: Oxford University Press; 1989.

#### 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](http://www.immunostep.com)