

Anti-Humano CD14 (47-3D6)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	14F-100T	100 test
PE	14PE-100T	100 test
APC	14 ³ -100T	100 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Otros nombres: Monocyte differentiation antigen CD14, Myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein.

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD14 deriva de células CD14 purificadas nativas de pulmón humano.

Clon: 47-3D6

Isotipo: Ratón IgG2a, kappa

Reactividad: Humano.

Fuente: Sobrenadante procedente de un cultivo invitro de células de un hibridoma celular

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 humano conjugado con un fluorocromo y en solución acuosa que contiene proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica (NaN₃).

Fluorocromo	Reactivo suministrado	Concentración (µg/ml)
FITC (Fluoresceína isotiocianato)	100 ug en 2 ml	50
PE (R-ficoeritrina)	25 ug en 2 ml	12,5
APC (Aloficocianina)	25 ug en 2 ml	12,5

USO PROPUESTO.

El CD14 clon 47-3D6 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de monocitos de muestras humanas que expresen CD14 por citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

El anticuerpo monoclonal de Immunostep CD14 puede usarse para la inducción de citoquinas y/o letalidad en el modelo murino con endotoxinas inducidas por choque o en E. coli viva.

Se encuentran formas solubles de CD14 en plasma a una concentración de aproximadamente 3 µg/ml, y, en sangre total, la cantidad de CD14 soluble excede la cantidad de CD14 unido a la membrana en 2-3 logs¹⁻⁶.

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD14 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD14. Para identificar estas células se incubó 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

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
- 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)^{7,8}. 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 NO SUMINISTRADOS.

- Controles isotípicos:

Fluorocromo	Control isotípico	Referencia Immunostep
FITC	Mouse IgG2a	ICIGG2AF-100UG
PE		ICIGG2APE-50UG
APC		ICIGG2AA-50UG

- Centrifuga
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm habituales para citometría de flujo
- 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
- Solución de lisis
- Citómetro de flujo equipado con láser y filtros adecuados al fluorocromo.
- Agitador Vortex

PREPARACIÓN 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 10⁶ 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.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD14 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 CD14 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.

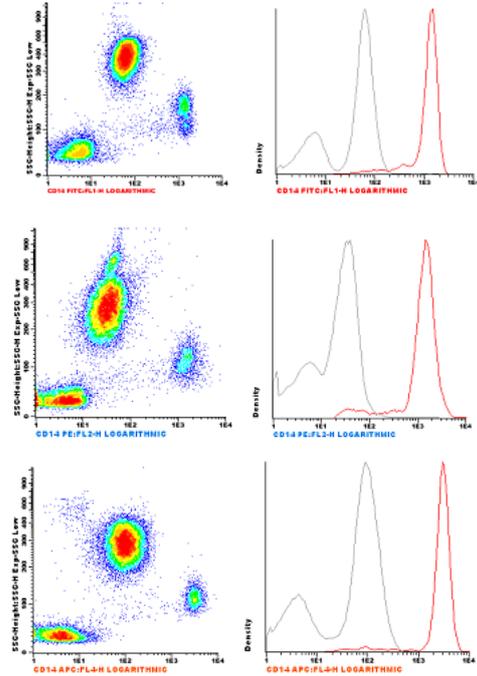


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de una muestra de sangre periférica normal marcada con CD14 y su complejidad interna (SSC). A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma.

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^{9,10,11}.

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

CARACTERÍSTICAS

ESPECIFICIDAD

La especificidad del CD14 se analizó mediante la obtención de muestras de sangre de donantes normales sanos caucásicos y se marcaron con anticuerpo monoclonal de Immunostep CD14. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de marcaje de antígenos de superficie y se analizaron por citometría de flujo. Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones de células), se estudiaron 10 muestras de sangre (5 para FITC) de donantes sanos, se marcaron con un control isotípico adecuado y el MAb para estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con el MAb mencionado. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

FITC		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	5	5	5
	Perdidos	0	0	0
Media		2,34	77,82	64,40
Mediana		1,83	86,72	58,81
Moda		1,39 (a)	31,51(a)	41,09 (a)
Desviación estandar		1,22	26,31	17,94
Varianza		1,49	692,28	322,01
Rango		3,07	65,20	46,28
PE		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	10	10	10
	Perdidos	0	0	0
Media		10,43	97,03	99,33
Mediana		9,53	98,83	99,79
Moda		6,55(a)	90,43(a)	96,52(a)
Desviación estandar		2,81	3,34	1,08
Varianza		7,93	11,16	1,17
Rango		8,45	9,32	3,46

APC		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	10	10	10
	Perdidos	0	0	0
Media		23,60	96,92	85,14
Mediana		27,41	100,00	88,66
Moda		6,12 (a)	100,00(a)	53,11(a)
Desviación estandar		11,65	6,85	13,14
Varianza		135,76	47,04	172,66
Rango		33,21	21,90	45,11

a. Existen múltiples modas. Se muestra el valor más pequeño.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de Immunostep CD14 se determinó marcando una muestra de sangre de donante normal. Se hicieron diluciones de una muestra de sangre periférica para verificar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

Esto sirve para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas variaciones (pero deliberadas) y proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

FITC	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
	0,996 (a)	0,992	0,991	2,18835
PE	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
	0,999(a)	0,998	0,998	1,21148
APC	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
	0,995(a)	0,990	0,989	2,95353

(a) Predictores: (Constantes), Obtenidos

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados de Immunostep CD14 se determinó realizando 10 determinaciones de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD14 +, alto, medio y bajo. Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD14. De esta manera, se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición.

Las 10 determinaciones para cada rango se realizaron mediante el marcaje, el procesamiento y el análisis de 10 muestras separadas. Los monocitos se seleccionaron para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada uno de los tres rangos.

Para realizar este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de un donante normal que expresa un alto porcentaje de células CD14 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD14 conocidas en proporciones apropiadas, mientras se mantenía la misma concentración celular total para los tres rangos.

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

FITC	N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion strd
Alto	10	9,56	10,60	9,91	0,32
Medio	10	5,40	6,10	5,60	0,19
Bajo	10	2,74	2,98	2,89	0,06
Valido N (lista)	10				
PE	N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion strd
Alto	10	81,58	87,85	85,56	2,06
Medio	10	60,96	69,75	66,33	2,54
Bajo	10	14,75	16,80	15,85	0,74
Valido N (lista)	10				
APC	N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion strd
Alto	10	77,46	80,30	79,08	0,81
Medio	10	56,80	59,30	57,88	0,87
Bajo	10	45,20	58,67	50,59	4,022
Valido N (lista)	10				

* Nota: Datos analizados con SPSS para Windows 11.0.1

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

- Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, Diaz-Agustin B, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Orfao A: Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. Clin Immunol 100:325-338, 2001.
- Knapp W., et al., 1989, Leukocyte Typing IV, Oxford Univ. Press 1989, See also contributions: M1.6, M3.2, M3.3, M15.1.
- Leucocyte Typing IV, ed. W. Knapp et al, Oxford University Press, Oxford 1989, 4th Workshop, Nr. M319 (BL467).
- Van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editors. Leukemia. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83-130.

- Turni L, Shaw S, Watson B, Mason D. CD guide. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, De Haas M, et al, editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 June; Harrogate, UK. Oxford, New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 761-3.
- Goyert SM, Haziot A, Jiao D, Katz IR, Kruger C, Ross J, Schütt C. M4. CD14 cluster workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, et al., editors. Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the Fifth International Workshop and Conference; Held in Boston, USA 3-7 November 1993. Volume One. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 778-82.
- 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.
- Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- 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)

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

