

Anti- Humano CD38 (GR7-A4; LD38)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	38FI-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

Otros nombres: ADP-ribosyl cyclase/cyclic, ADP-ribosyl cyclase I, ADPRC I, Cyclic ADP-ribose hydrolase I, cADPr hydrolase I, TIO.

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD38 deriva de células de la leucemia linfoblástica B aguda humana (B-ALL).

Clon: GR7-A4; LD38;

Isotipo: Ratón IgG1, kappa

HLDA: 5th International Workshops on Human Leucocyte Differentiation, WS Code T-076

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-CD38 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 (Fluorescein isothiocyanate)	100 ug en 2 ml	50

USO RECOMENDADO

El CD38 de Immunostep, el clon GR7-A4, es un anticuerpo monoclonal diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de linfocitos de muestras humanas que expresan CD38 mediante citometría de flujo.

RELEVANCIA CLINICA

El clon GR7-A4 está involucrado en el fenotipado y clasificación de la leucemia, el diagnóstico y la monitorización del mieloma múltiple, la monitorización de la infección por VIH-1 y su progresión.

La presencia de autoanticuerpos con especificidad anti-CD38 se ha demostrado en pacientes con diabetes mellitus tipo II

En ratones, está implicado en respuestas inmunes independientes de células T.⁽¹⁻⁵⁾

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD38 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD38. Para identificar estas células se incubaba 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)^{6,7}. 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	Ratón IgG1	ICIGGIF-100

- 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 DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Recolectar la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD38 y determinar el porcentaje de células marcadas. Es necesario usar un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que la del CD38, para evaluar y corregir la unión no específica de los linfocitos (consulte los materiales requeridos pero no suministrados). Establezca una región de análisis para eliminar el ruido de fondo de fluorescencia e incluir las células marcadas positivamente.

A continuación se muestra un diagrama de ejemplo del marcaje de sangre periférica:

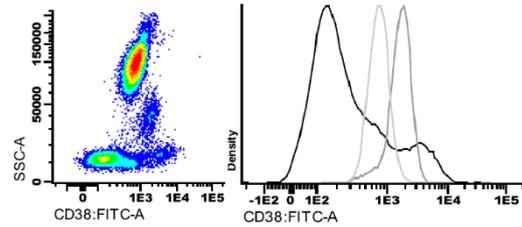


Fig. 1: a la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de linfocitos CD38+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

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 resultados⁸⁻¹⁰.

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

CARACTERÍSTICAS

ESPECIFICIDAD

El clon GR7-A4, se incluyó en el quinto taller internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, código WS T-076

El CD38 se expresa con niveles variables en la mayoría de las células hemopoyéticas, predominantemente durante la diferenciación temprana y la activación.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones celulares), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, se marcaron con un control isotípico adecuado y el MAb para estudiar.

Se obtuvieron muestras de sangre de donantes sanos normales de raza blanca. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un método de inmunofluorescencia directa para antígenos de membrana por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Estadística descriptiva

FITC					
% Linfocitos	10	24,2	54,35	38,238	10,11593
% Monocitos	10	65,21	96,05	86,405	10,69572
% Neutrofilos	10	56,98	86,47	71,401	8,63014
Validos N (lista)	10				

Existen múltiples modas, se muestra el valor mas bajo

LINEARIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD38 se determinó mediante el marcaje de una muestra de sangre de un donante sano. Se hicieron diluciones de una muestra de sangre periférica para verificar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas.

Esto se hace para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas variaciones (pero deliberadas), este estudio proporciona una indicación de la fiabilidad durante un uso normal.

Model Summary

Modelo	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
FITC	,998	,996	,996	1,44559

(a) Predictores: (Constante), Obtenidos

Los resultados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada. Se demostró la sensibilidad de CD38 de 1×10^5 a 1×10^6 células en 1×10^6 células totales.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad para los anticuerpos monoclonales conjugados de Immunostep CD38 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de linfocitos; alto, medio y bajo.

Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones. 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 linfocitos CD38 + 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 tres donantes diferentes que expresaban un porcentaje alto, medio y bajo de linfocitos.

FITC					
	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación std.
% altos	10	79,76	82,59	81,428	0,83908
% Medios	10	61,91	74,63	71,859	3,6621
% bajos	10	54,87	61,2	58,932	1,64538
Validos N (lista)	10				

*Nota: Datos analizados con SPSS para Windows 11.0.1

GARANTIA

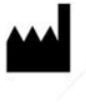
Los productos de Immunostep tienen garantía en cuanto a la cantidad y el contenido indicado en la etiqueta del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia a cualquier otra garantía. La responsabilidad de Immunostep se limita al replazo de los productos o el reembolso del precio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

REFERENCIAS

1. Ferrero E; Malavasi F. The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38. J. Leukoc. Biol. 1999 65:151 PubMed.
2. Lund F; Solvason N; Grimaldi JC; Parkhouse RM; Howard M. Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. Immunol. Today 1995 16:469 PubMed.
3. Malavasi F; Funaro A; Roggero S; Horenstein A; Calosso L; Mehta K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. Immunol. Today 1994 15:95 PubMed .
4. Mehta K; Shahid U; Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. FASEB J. 1996 10:1408 PubMed .
5. Shubinsky G; Schlesinger M. The CD38 lymphocyte differentiation marker: new insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. Immunity 1997 7:315 PubMed
6. 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.
7. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)

8. 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.
9. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
10. 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