# Anti- Humano LAMBDA (policlonal F(ab')$_2$)

| Fluorocromo | Referencia | Prueba |
|---|---|---|
| PE | **LPE2-100T** | **100 pruebas** |
| **FITC** | **LF2-100T** | **100 pruebas** |

IVD CE immunostep we know how

**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO**

**Clon:** Policlonal
**Isotipo:** Conejo F( ab') $_2$ IgG
**Aplicación probada:** citometría de flujo
**Inmunógeno:** Cadenas ligeras de inmunoglobulina policlonal de tipo Lambda aisladas de un pool de sueros humanos.
**Reactividad de las especies:** Humana
**Instrucciones de almacenamiento:** conservar en un lugar oscuro a 2-8 ºC.
**Tampón de almacenamiento :** solución tamponada acuosa que contiene estabilizador de proteínas y 0,09 % de azida de sodio ($NaN_3$).
**Uso recomendado:** Lambda F(ab') $_2$ de Immunostep está destinado a la detección y enumeración simultánea de linfocitos B portadores de cadenas ligeras lambda en sangre periférica mediante citometría de flujo. Este reactivo es eficaz para la tinción de inmunofluorescencia directa de tejido humano para análisis citométrico de flujo utilizando 10 µl/10 $^6$ células.
**Presentación:** Líquido. Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra cadenas ligeras lambda humanas, conjugado con un fluorocromo . Se suministra en una solución acuosa que contiene una proteína estabilizadora y azida sódica al 0,09 % ( $NaN_3$ ) como conservante.

| Fluorocromo | Suministrado reactivo | Concentración (mg/ml) | Volumen /prueba |
|---|---|---|---|
| FITC | 100 pruebas | 0,15 | 10 µL |
| PE | 100 pruebas | 0.1 | 10 µL |

**Fuente:** Sobrenadante procedente de sueros para cadenas ligeras lambda anti-humanas de conejo.
**Purificación:** Cromatografía de afinidad.

**RELEVANCIA CLÍNICA**

Este marcador puede ser usado solo o en combinación con otros marcadores de células B para el diagnóstico y seguimiento de diversas Neoplasias neoplásicas malignas e inmunodeficiencias. Los anticuerpos anti-kappa y anti-lambda son esenciales en el análisis inmunofenotípico de poblaciones de células B, lo que permite la detección de patrones de expresión de cadenas ligeras que ayudan a distinguir entre expansiones de células B policlonales y monoclonales.

En individuos sanos, las células B expresan cadenas ligeras de inmunoglobulina tipo kappa o lambda en una proporción relativamente constante, con una relación kappa:lambda típica de aproximadamente 2:1. Una desviación significativa de esta proporción, especialmente la presencia de una población dominante que exprese exclusivamente cadenas lambda, es indicativa de restricción de cadena ligera, un marcador de clonalidad en poblaciones B. Esta clonalidad es característica de diversas neoplasias hematológicas, como la leucemia linfocítica crónica (LLC), los linfomas no Hodgkin de células B y el mieloma múltiple.

El análisis por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-lambda permite detectar patrones anómalos de expresión de cadenas ligeras, lo que resulta fundamental para diferenciar entre proliferaciones policlonales reactivas y expansiones monoclonales neoplásicas. Esta distinción es esencial para un diagnóstico preciso, así como para establecer un pronóstico adecuado y tomar decisiones terapéuticas informadas.

Asimismo, la evaluación de la expresión de cadenas ligeras lambda es útil en el estudio de inmunodeficiencias primarias o secundarias, donde pueden observarse alteraciones en el desarrollo o la funcionalidad de las células B. En estos contextos, la detección precisa de la distribución kappa/lambda contribuye significativamente a la caracterización inmunológica del paciente.

**DETALLES DEL ANTÍGENO**

**Descripción extensa:** La evaluación de la expresión de kappa/lambda en la superficie celular permite identificar poblaciones de linfocitos B clonalmente restringidas y, por lo tanto, facilitar el diagnóstico de neoplasias hematológicas. Diversos trastornos de las células B se asocian con niveles reducidos de kappa/lambda en la superficie celular. [1-4]

**PRINCIPIOS DE LA PRUEBA**

El anticuerpo policlonal anti-lambda humano se une específicamente a las cadenas ligeras lambda expresadas en la superficie o el citoplasma de los linfocitos B. Para identificar estas células, la muestra se incuba con el anticuerpo conjugado con fluorocromo y se analiza mediante citometría de flujo. La intensidad de la fluorescencia refleja la presencia y abundancia relativa de cadenas ligeras lambda, lo que permite la caracterización de las poblaciones de linfocitos B y la evaluación de la clonalidad.

**CONDICIONES ADECUADAS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN**

Conservar en un lugar oscuro, refrigerado entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR. El anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial si se conserva entre 2 y 8 °C. No utilizar después de la fecha indicada.

Una vez abierto el vial, el producto es estable durante 90 días.

**EVIDENCIA DE DETERIORO**

No utilice los reactivos si observa cualquier indicio de deterioro. Para más información, póngase en contacto con nuestro servicio técnico: tech@immunostep.com

La apariencia normal del producto es un líquido semitransparente, inodoro e incoloro. No debe utilizarse si el medio líquido está turbio o contiene precipitados.

**RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS** ⚠

a) Los reactivos contienen azida sódica. En condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazoico, un compuesto altamente tóxico. Los compuestos de azida deben diluirse en agua corriente antes de desecharlos. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde podrían generarse condiciones explosivas. La ficha de datos de seguridad (FDS) está disponible en línea en www.immunostep.com.
b) Evite la contaminación microbiana del reactivo.
c) Proteger de la luz. Utilizar luz tenue durante la manipulación, la incubación con células y antes del análisis.
d) Nunca pipetee con la boca.
e) En caso de contacto con la piel, lavar con abundante agua.
f) Las muestras deben manipularse de la misma manera que las que pueden transmitir infecciones. Se deben garantizar procedimientos de manipulación adecuados.
g) No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en el vial.
h) Las desviaciones del procedimiento recomendado podrían invalidar los resultados del análisis.
i) PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO* .
j) Sólo para uso profesional.
k) Antes de adquirir las muestras, es necesario asegurarse de que el citómetro de flujo esté calibrado y compensado.

**RECOGIDA DE MUESTRAS**

La extracción de muestras de sangre venosa debe realizarse en tubos de recolección de sangre utilizando el anticoagulante adecuado (EDTA o heparina)[7,8] . Para obtener resultados óptimos, la muestra debe procesarse durante las seis horas posteriores a la extracción. Las muestras que no puedan procesarse dentro de las 48 horas posteriores a la extracción deben desecharse.
Por favor, consulte en www.immunostep.com soporte técnico para más información.

**GARANTÍA**

Se garantiza únicamente la conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta o en el etiquetado del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia por la presente a otras garantías. La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

## 1. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Centrífugo
- Tubos de ensayo de citometría de flujo de 12 x 75 mm de uso común
- Micropipetas para dispensar volúmenes de 5 µl a 2 ml
- Tubos de recolección de sangre con anticoagulante.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) con azida sódica al 0,09 % . Se recomienda añadir BSA al 0,5 %.
- Sistema de vacío
- Solución de lisis (Ref. RBC-10X)
- Citómetro de flujo equipado con láser y filtros fluorocromos adecuados
- Agitador Vortex

## 2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: PROCEDIMIENTO CON PRELAVADO

1. Pipetee 300 µL de muestra en un tubo Falcon de 10 mL.
2. Agregue 6 mL de tampón de lavado y mezcle bien, preferiblemente mediante un vórtex suave .
3. Llene el tubo hasta 10 mL agregando 4 mL adicionales de tampón de lavado.
4. Mezcle bien nuevamente mediante un suave vórtex .
5. Centrifugar a 540 g durante 5 minutos.
6. Deseche cuidadosamente el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío, evitando alterar el pellet celular.
7. Resuspender el pellet con cuidado.
8. Repita los pasos 2 a 7 dos veces más (para un total de tres pasos de lavado).
9. Después del lavado final, resuspenda el pellet celular en 300 µL de tampón de lavado.
10. Continuar con el protocolo estándar para la tinción de anticuerpos de superficie o intracelulares.

Nota 1: Para muestras de pequeño volumen (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo o aspirados vítreos), centrifugue todo el volumen a 540 g durante 5 minutos, deseche el sobrenadante y resuspenda en 300 µL de tampón de lavado antes de continuar.

Adquiera las muestras con un citómetro de flujo o consérvelas en un lugar oscuro a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta que se realice el análisis. Las muestras deben adquirirse dentro de las 3 horas posteriores a la lisis.

## 3. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Recopile la fluorescencia atribuida al anticuerpo y determine el porcentaje de células positivas . Es necesario utilizar un control isotópico conjugado con el mismo fluorocromo , del mismo tipo de inmunoglobulina y concentración, para evaluar y corregir la unión inespecífica de los linfocitos *(consulte los materiales necesarios, pero no incluidos).* Establezca una región de análisis para eliminar el ruido de fondo de la fluorescencia e incluir las células marcadas positivamente .

## 4. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La incubación de anticuerpos con células durante procedimientos distintos a los recomendados puede

provocar una reducción o pérdida de determinantes antigénicos de la superficie celular.

2. Los valores obtenidos de individuos normales pueden variar de un laboratorio a otro, por lo que se sugiere que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia normal.
3. Las células o líneas celulares anormales pueden presentar una mayor densidad antigénica que las células normales. En algunos casos, esto podría requerir el uso de una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal que la indicada en los procedimientos de preparación de la muestra.
4. En muestras de sangre completa, los glóbulos rojos presentes en muestras anormales, así como los glóbulos rojos nucleados (tanto de muestras normales como anormales), pueden ser resistentes a la lisis. Podrían requerirse periodos más largos de lisis de los glóbulos rojos para evitar la inclusión de células no lisadas en la región de linfocitos.
5. Las muestras de sangre no deben refrigerarse durante un período prolongado (más de 24 horas), ya que el número de células viables disminuirá gradualmente, lo que podría afectar el análisis. Para obtener los mejores valores, deben conservarse a temperatura ambiente inmediatamente antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal.
6. La obtención de resultados precisos con procedimientos citométricos de flujo dependen de la correcta alineación y calibración de los láseres, así como de la correcta configuración de las puertas.

## 5. VALORES DE REFERENCIA

Los resultados anormales en el porcentaje de células que expresan el antígeno o en sus niveles de expresión pueden deberse a afecciones patológicas. Es recomendable conocer los patrones normales de expresión del antígeno para asegurar una correcta interpretación de los resultados. [4, 5, 6]

Los valores obtenidos de individuos sanos pueden variar de un laboratorio a otro, por lo que se sugiere que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia normal.

## 6. CARACTERÍSTICAS

*ESPECIFICIDAD*

Los anticuerpos policlonales de conejo contra las cadenas ligeras lambda humanas reconocen específicamente la subunidad lambda de las inmunoglobulinas, que se expresa en la superficie de aproximadamente un tercio de los linfocitos B maduros en la sangre periférica, así como en un subconjunto de células B inmaduras en la médula ósea.

1. Perfiles de población cellular

Para evaluar la especificidad analítica, se realizó un estudio comparativo con un panel de citometría de flujo multicolor que incluía el anticuerpo de prueba (Immunostep) y un anticuerpo de referencia. Se analizaron muestras de sangre periférica de donantes sanos para evaluar la expresión de marcadores en diversas subpoblaciones leucocitarias.

El anticuerpo de prueba mostró una tinción intensa y específica de los linfocitos B $CD19^+$, con una positividad media del 30,9 % y una baja variabilidad (CV = 3,11 %). También se identificaron claramente subgrupos como los linfocitos B vírgenes ($CD27^-$/ $IgD^+$ ) y los linfocitos B de memoria ($CD27^+$/ $IgD^-$ ), lo que confirma la capacidad del anticuerpo para detectar cadenas ligeras lambda en diferentes etapas de la maduración de los linfocitos B. Se observó una tinción mínima o nula en linfocitos T, linfocitos NK y granulocitos, lo que respalda la especificidad del anticuerpo.

En particular, las células dendríticas plasmocitoides ($CD123^+$/$HLA\text{-}DR^+$) y las células dendríticas derivadas de monocitos ($CD16^-$/$CD14^-$) también mostraron una alta positividad, en consonancia con los patrones de expresión conocidos de inmunoglobulinas de superficie en ciertos subconjuntos de células presentadoras de antígenos.

2. Ensayo de bloqueo

Para confirmar aún más la especificidad, se realizó un experimento de bloqueo con el anticuerpo de referencia anti-lambda $F(ab')_2$. Las muestras se tiñeron simultáneamente con los anticuerpos de prueba y de referencia en combinaciones recíprocas. No se observó un bloqueo completo, lo que indica que los anticuerpos se unen a epítopos distintos o no solapados, como se espera para los reactivos policlonales.

Estos resultados confirman la especificidad analítica del anticuerpo anti-lambda para aplicaciones de citometría de flujo, lo que respalda su uso en la identificación de subconjuntos de células B, la evaluación de la clonalidad y la evaluación de inmunodeficiencias .

*SENSIBILIDAD*

La sensibilidad analítica del anticuerpo anti-lambda se evaluó mediante un modelo de dilución seriada con las líneas celulares Daudi ($lambda^+$) y Namalwa ($lambda^+$). Cada dilución se ajustó a una concentración final de $1 \times 10^5$ células por tubo y se analizó por duplicado en nueve niveles de concentración, siguiendo el enfoque estadístico descrito en la guía del CLSI «Evaluación de la linealidad de los procedimientos de medición cuantitativa: Un enfoque estadístico; Guía aprobada», Apéndice C.

Se calculó la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada nivel de dilución. Los resultados demostraron una fuerte relación lineal entre el nivel de dilución y la MFI, con un coeficiente de determinación ($R^2$) de 0,99, lo que indica una excelente linealidad en todo el rango de análisis.

| Marcador | R2 | % de LoB | % de límite de detección | % de límite de calidad |
|---|---|---|---|---|
| FITC | 0.999 | 1.73 | 2.01 | 6.41 |
| PE | 0.996 | 0.647 | 0.656 | 4.2 |

El límite de blanco ( LoB ), el límite de detección ( LoD ) y el límite de cuantificación (LoQ) confirman la alta sensibilidad del ensayo y su cuantificación fiable a bajas concentraciones.

Estos hallazgos confirman que el anticuerpo proporciona una señal confiable y proporcional en una amplia gama de concentraciones de antígeno, lo que respalda su uso en aplicaciones de citometría de flujo cuantitativa.

*PRECISIÓN*

La precisión se evaluó siguiendo la directriz CLSI EP05-A3 mediante un diseño de estudio 3×3×2×3, que incluyó tres niveles de muestras (bajo, medio, alto), tres lotes de reactivos independientes, dos citómetros de flujo Cytek Aurora y tres réplicas por condición. El estudio no incluyó la variabilidad entre días ni entre operadores. La adquisición de datos se realizó con los instrumentos Cytek Aurora y el análisis se realizó con el software Infinicyt ™ (BD Biosciences). Este diseño permitió evaluar tanto la repetibilidad (precisión intraensayo) como la precisión intermedia entre instrumentos y lotes de reactivos en condiciones controladas de laboratorio.

**Repetibilidad**

Para evaluar la variabilidad y repetibilidad intraensayo, se analizaron tres réplicas por nivel de muestra con tres lotes de reactivos y dos citómetros de flujo Cytek Aurora, lo que resultó en un total de 54 mediciones por nivel de muestra. La desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV% ) se calcularon para cada condición utilizando datos procesados en Infinicyt ™ (BD Biosciences), lo que proporcionó una estimación robusta de la repetibilidad en entornos de laboratorio controlados.

| Marcador | Repetibilidad SD | Repetibilidad %CV | SD dentro del sitio | %CV dentro del sitio |
|---|---|---|---|---|
| FITC | 0.66 | 1.5 | 0.46 | 1.1 |
| Educación física | 1.59 | 4.2 | 2.56 | 5.2 |

Estos resultados demuestran una excelente repetibilidad y un rendimiento constante en diferentes lotes de reactivos y condiciones de prueba dentro del mismo laboratorio en condiciones de laboratorio controladas.

**Precisión entre laboratorios**

La precisión interlaboratorio se evaluó mediante el análisis de tres réplicas por nivel de muestra. Si bien el estudio no incluyó la variabilidad diaria, el uso de dos instrumentos independientes y múltiples lotes de reactivos permitió estimar la precisión intermedia en condiciones interlaboratorio controladas. Se analizaron los datos y se calcularon la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV% ) para caracterizar la variabilidad atribuible a las diferencias en la instrumentación y los lotes de reactivos. La variabilidad entre laboratorios y lotes fue insignificante, con:

| Marcador | SD entre laboratorios | %CV entre laboratorios | SD entre lotes | %CV entre lotes |
|---|---|---|---|---|
| FITC | 0 | 0 | 1.72 | 2.6 |
| Educación física | 1.55 | 3,99 | 2.43 | 3.7 |

Esto confirma la consistencia del rendimiento de los anticuerpos en diferentes lotes de producción y laboratorios.

**Reproducibilidad**

La reproducibilidad se evaluó mediante la evaluación de tres réplicas por nivel de muestra en tres lotes de reactivos y dos citómetros de flujo Cytek Aurora, con un total de 54 mediciones por nivel de muestra. Si bien el estudio no incluyó la variabilidad interdiaria ni interoperador, el uso de múltiples instrumentos y lotes de reactivos en diferentes laboratorios proporcionó una estimación significativa de la reproducibilidad en condiciones controladas de múltiples laboratorios. El análisis de datos se realizó con Infinicyt ™ (BD Biosciences) y se calcularon la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación ( CV% ) para cuantificar la variabilidad general atribuible a las diferencias entre laboratorios y equipos.

La reproducibilidad se evaluó utilizando muestras estabilizadas procesadas en múltiples laboratorios. Los resultados fueron los siguientes:

| Marcador | Reproducibilidad SD | Reproducibilidad %CV |
|---|---|---|
| FITC | 0.63 | 1.5 |
| PE | 4.48 | 10.2 |

Estos resultados confirman que el anticuerpo proporciona una tinción consistente y reproducible en diferentes condiciones de prueba.

## 7. GARANTÍA

Se garantiza únicamente la conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta o en el etiquetado del producto en el momento de la entrega al cliente. La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

## 8. BIBLIOGRAFÍA


1. Procedimientos para la recolección de muestras de sangre para diagnóstico mediante venopunción - Norma aprobada; Quinta edición (2003). Wayne PA: Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico; Documento H3-A5.
2. Procedimientos estándar para la recolección de muestras de sangre para diagnóstico", publicado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS)
3. Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo: Control de calidad e inmunofenotipado de linfocitos; guía aprobada (1998). Wayne PA: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico; Documento H42-A.
4. Kotylo PK et al. Rangos de referencia para subpoblaciones linfocitarias en pacientes pediátricos . Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
5. Reichert et al. Rangos de referencia de subgrupos linfocitarios en adultos caucásicos. Clin. Inmunol Inmunopatología 60:190-208 (1991)
6. Malcolm S, Barton P, Murphy C, Ferguson-Smith MA, Bentley DL, Rabbitts TH. Localización de genes de la región variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana en el brazo corto del cromosoma 2 mediante hibridación in situ. Proc Natl Acad Sci US A. 1982 agosto ;79 (16):4957-61.
7. Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, van Dongen JJM; Euroflujo . "Disección inmunofenotípica de la hematopoyesis normal" . Métodos J Immunol . Diciembre de 2019 ; 475: 112684 .
8. CLSI EP05-A3. Evaluación de la precisión de los procedimientos de medición cuantitativa; Directriz aprobada, tercera edición.

9. Rijkers GT1, Scharenberg JG, Van Dongen JJ, Neijens HJ, Zegers BJ. Transducción de señales anormales en un paciente con enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave. Res. Pediatra . 1991 marzo;29
10. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. Los linfocitos CD8+ pueden controlar la infección por VIH in vitro al suprimir la replicación viral. Science. 19 de diciembre de 1986.

**9. FABRICADO POR**

**Immunostep S.L**
Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Cancer Research Center (CIC)
Campues Miguel de Unamuno
37007 Salamanca (Spain)
Tel. (+34) 923 294 827
**www.immunostep.com**