

Anti-Humano CD10 (HI10a)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	IOF-100T	100 test
PE	IOPE-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

Otros nombres: Neutral endopeptidase, Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen (CALLA), Nephilysin, Atriopeptidase, Enkephalinase, Neutral endopeptidase 24.11, Skin fibroblast elastase

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD10 procede de células de leucemia.

Clon: HI10a

Isotipo: Ratón IgG1, 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-CD10 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)	50 ug en 2 ml	25
PE (R-ficoeritrina)	25 ug en 2 ml	12,5

USO RECOMENDADO

El anticuerpo monoclonal CD10 de Immunostep, el clon HI10a, está diseñado para diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración del antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA) humana mediante citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

El anticuerpo monoclonal de ratón CD10 anti-humano, se puede usar para definir células malignas tipificadas como leucemia linfoblástica aguda común de células B, leucemias de células T, linfoma, melanoma y líneas celulares de glioma.¹⁻³

PRINCIPIOS DEL TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD10 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD10. Para identificar estas células, la muestra se incuba con el anticuerpo y se analiza mediante citometría 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)^{4,5}. 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
PE		ICIGGIPE-50

- 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. Centrifugar un tubo de sangre recién extraída con EDTA (600 rpm o 75 xg, 20')
2. Retirar las plaquetas (capa superior) y lavar dos veces con PBS y BSA al 2%. Volver a resuspender en PBS.
3. Agregar el volumen apropiado del anticuerpo y mezclar suavemente con un vortex. El volumen óptimo debe ser determinado por cada laboratorio individualmente.
4. Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos.
5. El control negativo recomendado es un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo (consulte los materiales requeridos pero no suministrados).
6. Agregar 2 mL 0.01 mol/L de PBS (preferiblemente con albúmina de suero bovino al 2%) y resuspender las células usando un vortex.
7. Centrifugar a 1000 x g durante 5 minutos. Aspirar suavemente el sobrenadante y desécharlo dejando aproximadamente 50 µL de líquido.

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 CD10 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 CD10 para estimar y corregir la unión no específica (*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.

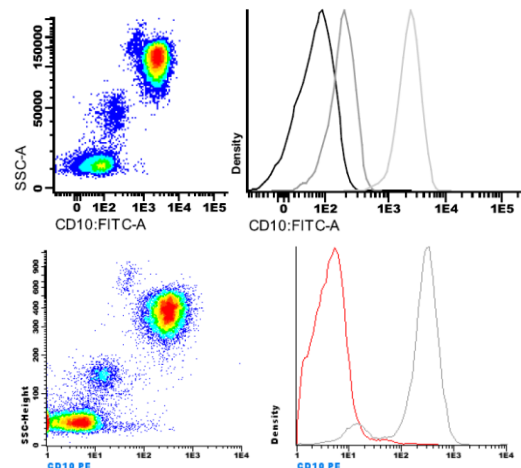


Fig. 1: A la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de plaquetas CD10+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

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 período 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^{6,7,8}

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

CARACTERISTICAS

ESPECIFICIDAD

El CD10 clon H10a reconoce la endopeptidasa neutra, una glucoproteína transmembrana de tipo II de 95 kD, que se conoce como el antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA) expresado en células de leucemia linfoblástica aguda común que se observa en los linfocitos B tempranos y en las células madre de linfocitos y timocitos inmaduros. El antígeno es una endopeptidasa neutra.

Las muestras de sangre se obtuvieron de donantes sanos normales de raza caucasica y se marcaron con el anticuerpo monoclonal de Immunostep CD10. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron para su análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un método de marcaje de leucocitos por inmunofluorescencia directa para su análisis por citometría de flujo.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones de células), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, se marcaon con un control de isotipico 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:

		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos	
FITC	N	Validos	10	10	10
		Perdidos	0	0	0
		Media	1,80	48,29	93,31
		Mediana	1,70	47,04	94,95
		Moda	0,69	39,17	85,08
		Desviación estandar	0,84	6,84	5,16
		Varianza	0,70	46,84	26,70
		Rango	2,69	23,18	13,85
	PE		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N		Validos	10	10	10
		Missing	0	0	0
		Media	3,80	5,59	99,53
		Mediana	3,35	5,86	99,81
		Moda	2,03	1,70	99,88
		Desviación estandar	1,59	2,63	0,60
		Varianza	2,52	6,91	0,36
		Rango	4,32	8,20	1,96

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD10 se determinó marcando una muestra de sangre del 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.

Para proporcionar una indicación de su fiabilidad durante su uso normal, se determinó la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas, pero deliberadas variaciones.

Modelo	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
FITC	0,996a	0,991	0,990	2,34014
PE	0,997a	0,993	0,992	1,61979

(a) Predictors: (Constant), Obtained

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del anticuerpo monoclonal conjugado CD10 de Immunostep se llevó a cabo realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD10 +, alto, medio y bajo. Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD10. 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 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 CD10 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD10 conocidas en proporciones apropiadas, mientras se mantenía la misma concentración celular total para los tres rangos.

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

		N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion stdr.	Coef. Variacion
FITC	Alto	10	72,17	72,17	73,49	1,02	1,04
	Medio	10	56,10	56,10	57,63	0,93	0,85
	Bajo	10	46,09	46,09	46,76	0,56	0,32
	Valido N (lista)	10					
PE	Alto	10	74,18	76,27	75,52	0,69	0,09
	Medio	10	57,30	59,05	58,41	0,51	0,87
	Bajo	10	42,43	44,97	43,76	0,72	1,64
	Valido N (lista)	10					

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. Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood
1998;83:967-973.
2. Taberero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, Lopez-Berges MC, Rasillo A, Garcia-Sanz R, et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. Leukemia 2001 Mar;15(3):406-14.
3. Castoldi G. Recent advances in the cytobiology of leukemias. Haematologica 1997 Jan-Feb;82(1):1-3.
4. 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.
5. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
6. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
7. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
8. 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

VIGILANCIA Y NOTIFICACIÓN

De acuerdo con el Anexo I, sección 20.4.1(n) del Reglamento (UE) 2017/746, el usuario tiene la obligación de notificar cualquier incidente grave relacionado con el uso del producto.

- **Al Fabricante:** Contacte con nuestro departamento de Vigilancia en vigilancia@immunostep.com
- **A la Autoridad Competente:** Notifique a través de los canales oficiales del Estado miembro.

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS



CE etiquetado



In vitro dispositivo de diagnóstico



Fabricado



Presta atención a