

Anti-Humano CD13 (WM15)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	I3F2-I00T	100 test
PE	I3PE2-I00T	100 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Otros nombres: Aminopeptidase N, Alanyl aminopeptidase, Aminopeptidase M, Microsomal aminopeptidase, Myeloid plasma membrane glycoprotein CD13, gp150.

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD13 deriva de células humanas AML.

Clon: WM15

HLDA: El anticuerpo anti-CD13 clon WM15 fue incluido en el 5º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código MA191.

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-CD13 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 (Ficoeritrina)	50 ug en 2 ml	25

USO PROPUESTO.

El CD13 clon WM15 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de leucocitos de muestras humanas que expresen CD13 por citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

Este anticuerpo se utiliza como marcador para la determinación de leucemia mieloide aguda y desempeña un papel en la invasión tumoral. En el caso de la infección por coronavirus humano 229E (HCoV-229E), sirve como receptor para la glicoproteína HCoV-229E, también actúa como mediador de la infección por citomegalovirus humano (HCMV).¹⁻⁸

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD13 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD13. 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)^{9,10}. 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 IgG1	ICIGGIF-100UG
PE		ICIGGIPE-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:

- 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*)
- Añadir 100 µL de muestra (hasta 10⁶ células) y mezclar adecuadamente en el vortex.
- Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C) durante 15 minutos o a 4° C durante 30 minutos.
- 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.
- 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.
- Resuspender el pellet.
- Añadir 2 ml de PBS (*ver materiales requeridos pero no suministrados*)
- 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.
- 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 CD13 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 CD13 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.

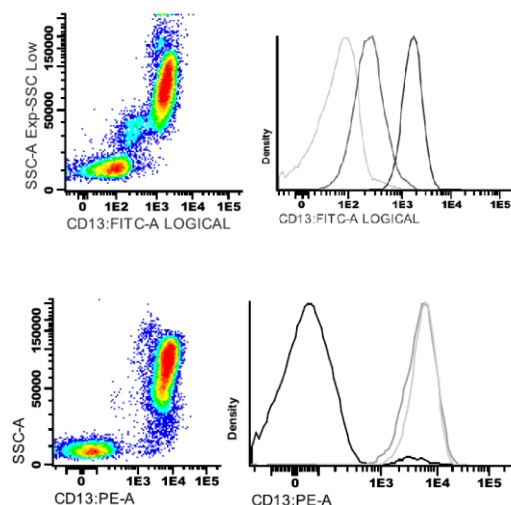


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de sangre periférica marcada con CD13 y su complejidad interna (SSC). A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 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.
- Los valores obtenidos de individuos normales pueden variar entre distintos laboratorios, por tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 resultados¹¹⁻¹³.

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 MW15 anti-CD13 fue incluido en el 5° taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código MA191.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones de células), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, se marcaron con un control isotípico adecuado y el MA15 para estudiar.

Las muestras de sangre obtenidas de donantes sanos, normales, caucásicos, se marcaron con anticuerpo monoclonal de Immunostep CD13. Se analizó la fluorescencia no específica identificada por el control isotípico conjugado IgG1. Las células contenidas en las regiones de linfocitos T y B, monocitos, plaquetas y eritrocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de marcaje de antígeno de superficie celular para citometría de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Statidísticas						
PE		% control isotípico	% Linfocitos T	% Linfocitos B	% Plaquetas	% Eritrocitos
N	Validos	10	10	10	10	10
	Perdidos	0	0	0	0	0
Media		0,09	,011	0,04	0,06	0,08
Desv. Stadr		0,05	0,00	0,02	0,03	0,08
Minimo		0,02	0,00	0,02	0,01	0,01
Maximo		0,16	0,02	0,10	0,09	0,30
FITC		% control isotípico	% Linfocitos T	% Linfocitos B	% Plaquetas	% Eritrocitos
N		10	10	10	10	10
Media		0,28	0,01	0,01	0,01	0,05
Desv. Stadr		0,17	0,01	0,01	0,01	0,05
Minimo		0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Maximo		0,73	0,03	0,04	0,04	0,17

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD13 se determinó mediante el marcaje de la línea celular U937 como población positiva y la línea celular Jurkat como población negativa. Las células se mezclaron en diferentes proporciones con un número final constante de 1×10^6 células para lograr diferentes relaciones celulares de 0% de células positivas a 100%.

Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo de acuerdo con la cantidad recomendada durante 15 minutos. Finalmente las células se lavaron de acuerdo con el protocolo estándar. Se calculó una regresión lineal entre los valores esperados y los valores observados.

Para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado se llevaron a cabo pequeñas (pero deliberadas) variaciones. Esto, proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Resumen del modelo ^b				
FITC				
R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación	Regression lineal
1,000 ^a	1,000	1,000	0,70731	y = 1.006x - 0,649
PE				
R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación	Regression lineal
0,996 ^a	0,993	0,992	3,12516	y = 0,997x - 3,928

a. Predictores: (Constante), % Esperados

b. Variable dependiente: % Obtenidos

Los resultados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada. La sensibilidad de CD13 se demostró de 1×10^5 a 1×10^6 células en 1×10^6 células totales.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del anticuerpo monoclonal conjugado de Immunostep CD13 se determinó realizando 10 determinaciones repetidas en tres rangos de leucocitos: alto, medio y bajo. Se utilizó una muestra para cada rango. Así, se realizaron un total de 10 determinaciones para cada tipo de rango. De este modo se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición.

Las 10 determinaciones para cada rango se realizaron por marcaje, procesamiento y análisis de 3 muestras separadas. Se seleccionaron las células CD13+ para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada medida.

Para llevar a cabo este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de donantes normales que expresan un porcentaje diferente de leucocitos.

Estadsitica					
FITC			Porcentaje		
			Altos	Medios	Bajos
Valor	N	Validos	10	10	10
		Perdidos	0	0	0
	Media		74,29	68,12	93,83
	Desv. standr		0,36	2,11	0,19
	Minimo		73,64	62,62	93,36
	Maximo		74,77	69,32	94,05
	PE			Porcentaje	
Altos				Medios	Bajos
Valor	N	Validos	10	10	10
		Perdidos	0	0	0
	Media		75,29	69,65	94,37
	Desv. standr		0,43	0,39	0,35
	Minimo		74,57	69,06	93,91
	Maximo		75,81	70,18	94,94

Los resultados demuestran una alta reproducibilidad de las mediciones independientemente de los valores de los leucocitos totales.

REPETIBILIDAD

Para determinar la repetibilidad del marcaje con este producto, se marcaron 10 muestras diferentes con dos lotes diferentes de este reactivo. Para cada muestra se obtuvieron dos valores diferentes: la intensidad de fluorescencia media (MFI) y el porcentaje de células positivas. Se calcularon la media de la desviación estándar de cada muestra para la IMF y el porcentaje de células positivas. Los resultados del análisis se muestran en el siguiente cuadro:

FITC	Media	Desviac- estandar	% CV medio
% positivas	50,70	1,34	2,65
IMF	52,60	1,85	3,52
Validos N (lista)	10	10	10
PE	Media	Desviac- estandar	% CV medio
% positivas	59,74	1,34	2,25
IMF	209,57	9,03	4,31
Validos N (lista)	10	10	10

*nota: datos analizados con SPSS para Windows 21

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. Cui WJ, Zhang D, Cunningham MT, Tilzer L. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *Int J Lab Hematol*. 2014 Mar 6.
2. Favaloro EJ, et al. Further characterisation of myeloid antigens (pg 169,95 gp 150 and gp67): investigation of epitopic heterogeneity and non-haematopoietic distribution using panels of monoclonal antibodies belonging to CD11b, CD13 and CD33. *Br. J. Haematol*. 69: 163-171 (1988).
3. Favaloro EJ et al. CD13 (GPI50; aminopeptidase-N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated. *Exp Hematol* 21:1695-701 (1993).
4. Favaloro EJ et al. The hepatobiliary disease marker serum alanine aminopeptidase predominantly comprises an isoform of the haematological myeloid differentiation antigen and leukaemia marker CD-13/gp150. *Clin Chim Acta* 220:81-90 (1993).
5. Thalhammer-Scherrer R, Mitterbauer G, Simonitsch I, Jaeger U, Lechner K, Schneider B, et al. The immunophenotype of 325 adult acute leukemias. Relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. *Am J Clin Pathol* 2002;117:380-9.
6. Turni L, Shaw S, Watson B, Mason D. CD guide. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. *Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens*. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 761.
7. Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13 – not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999;20:83-8.
8. Ashmun RA, Holmes KV, Shapiro LH, Favaloro EJ, Razak K, de Crom RPG, et al. M3. CD13 (aminopeptidase N) cluster workshop report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. *Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens*. Proceedings of the Fifth International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. Volume I. p. 771-5.
9. 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.
10. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
11. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
12. Kotlyo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993).
13. 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
	<i>In vitro</i> dispositivo de diagnóstico
	Fabricado
	Presta atención a