

Anti-Humano CD15 (MCS-1)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	15F-100T	100 test
PE	15PE-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Otros nombres: 3-FAL antibody, Alpha-3-

fucosyltransferase antibody, ELAM 1 ligand antibody
Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD15 deriva de los glóbulos blancos.

Clon: MCS-1

HLDA: HLDA: 5° Taller internacional sobre diferenciación de leucocitos humanos, Código WS MA063

Isotipo: Ratón IgG3

Reactividad: Humano

Fuente: Sobrenadante procedente de un cultivo celular in vitro de un hibridoma celular

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD15 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)	150 ug en 2 ml	75
PE (R-Phycoerythrin)	25 ug en 2 ml	12,5

USO RECOMENDADO

El CD15 de Immunostep, clon MCS-1, es un anticuerpo monoclonal diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de leucocitos de muestras humanas que expresan CD15 mediante citometría de flujo.

RELEVANCIA CLINICA

Este anticuerpo se usa para la identificación de células de Hodgkin mononucleares y células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin.⁽¹⁻⁶⁾

PRINCIPIOS DEL TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD15 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD15. 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)^{3,4}. 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 IgG3	ICIGG3F-100UG
PE	Ratón IgG3	ICIGG3PE-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 CD15 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 CD15 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.

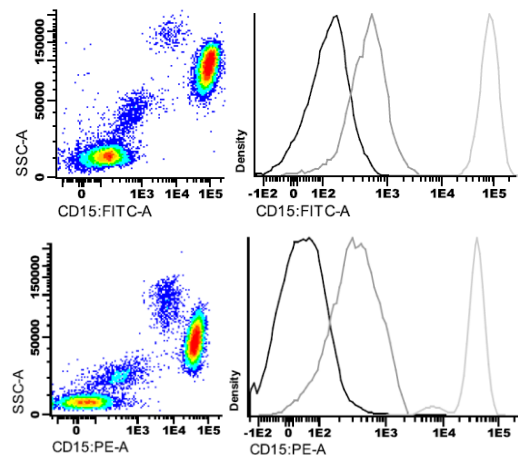


Fig. 1. A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de sangre periférica normal marcada con CD15 y su complejidad interna (SSC). A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma

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.

CARACTERISTICAS

ESPECIFICIDAD

El antígeno CD15 es el hapteno X en lacto-N-fucosa pentaosil II, que se expresa en granulocitos circulantes o granulocitos tisulares, así como en neutrófilos y eosinófilos. El anticuerpo CD15 reconoce la estructura de carbohidratos 3-fucosil-N-acetil-lactosamina. Específicamente los neutrófilos, los eosinófilos y las células precursoras monoblastoides del linaje mielóide.

HLDA: 5º Taller internacional sobre diferenciación de leucocitos humanos, Código WS MA063

Para el estudio de especificidad se obtuvieron muestras de sangre de donantes normales sanos y se marcaron con el anticuerpo monoclonal de Immunostep CD15. 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 marcaje de leucocitos por inmunofluorescencia directa para su análisis por de 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 marcaron con un control isotópico adecuado y el MAb a estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con el MAb mencionado. Los resultados obtenidos para CD15 PE se muestran en la siguiente tabla:

		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	10	10	10
	Perdidos	0	0	0
Media		9,3000	65,0340	99,2660
Mediana		9,2750	63,3100	99,9350
Moda		3,76 (a)	46,44 (a)	99,98 (a)
Desviacion Stdr		3,02855	11,06578	1,92416
Varianza		9,17209	122,45147	3,70238
Rango		12,00	34,39	6,18

(a) existen múltiples modas. Se muestra el valor más pequeño

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD15 se determinó marcando una línea celular positiva (U937) y una línea celular negativa (Ramos). 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.

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

Resumen del modelo ^b				
	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
FITC	0,99 ^a	0,99	0,99	2,791
PE	1,00 (a)	1,00	1,00	0,00

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 CD15 se demostró de 1×10^5 a 1×10^6 células en 1×10^6 células totales

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados de Immunostep CD15 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD15 +, alto, medio y bajo.

Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD15. 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 leucocitos 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 CD15 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD15 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 la manera en que cada laboratorio obtuvo, marcó y analizó muestras de sangre separadas.

	N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion Stdr
Altos	10	80,30	82,16	81,6140	,64426
Medios	10	69,09	72,36	70,1270	,99143
Bajos	10	63,87	68,88	67,4360	1,39547
Validos N (lista)	10	PE			
Altos	10	57,78	59,42	58,6870	0,14406
Medios	10	54,99	55,92	55,4400	0,10360
Bajos	10	70,00	71,49	70,7490	0,13937
Validos N (lista)	10	FITC			

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

EXACTITUD o REPETIBILIDAD

Para determinar la repetibilidad del marcaje con este producto, se marcaron 5 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:

	M1	M2	M3	M4	M5
% positivas	64,02	52,02	55,49	54,32	68,13
Desviación stdr. % positivas	0,38	0,151	0,17	0,39	0,06
MFI	1206,50	698,50	1757,00	659,01	846,00
Desviación stdr de MFI	89,806	14,43	8,76	62,00	53,75
Validos N (lista)	2	2	2	2	2

	Media	Media desviación stdr	Media %CV
% positivas	58,7970	0,2336	0,40
IMF	1033,4043	45,7526	5,15
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. Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, Lopez-Berges MC, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Tabernero MD, Garcia-Marcos MA, Rasillo AI, Hernandez-Rivas J, San Miguel JF. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica*. 1999 May;84(5):405-12.
2. Civin, C. L., J. Mirro, and M. L. Banquerigo. 1981. *Blood* 57: 842.
3. Majdic, O., K. Liszka, D. Lutz, and W. Knapp. 1981. *Blood* 58:1127.
4. Huang, L. C., C. I. Civin, J. L. Magnani, J. H. ShaFITCr, and V. Ginsberg. 1983. *Blood* 61: 1020.
5. Howie, A. J., G. Brown, A. G. Fisher, and M. Khan. 1984. *J. Clin. Pathol.* 37: 555.
6. Skubitz, K. M., J. R. Mendiola, and M. S. Collett. 1988. *J. Immunol.* 141: 4318.
7. 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.

8. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
9. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
10. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
11. 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