

Anti-Humano CD19 (A3-B1)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	19F1-100T	100 test
PE	19PE1-100T	100 test
APC	19A1-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Otros nombres: B-lymphocyte antigen CD19, B-lymphocyte surface antigen B4, Differentiation antigen CD19, T-cell surface antigen Leu-12, B4

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD19 deriva de las amígdalas humanas.

Clon: A3-B1

Isotipo: Ratón IgG2a, kappa

Reactividad: Humano.

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

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD19 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 in 2 ml	25
PE (R-Phycoerythrin)	50 ug in 2 ml	25
APC (Allophycocyanin)	30 ug in 2 ml	15

USO PROPUESTO.

El anticuerpo monoclonal CD19 de Immunostep, clon A3-B1, está diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de linfocitos en muestras humanas que expresan CD19 mediante citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

El anticuerpo monoclonal CD19 se puede usar para identificar y enumerar los linfocitos CD19 + B en sangre periférica humana.

Esto puede ser importante porque en combinación con otros marcadores, sirve para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades de inmunodeficiencia, incluida la agammaglobulinemia, la enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y la enfermedad de inmunodeficiencia variable común (CVID), en la que se muestra una cantidad reducida de linfocitos B circulantes. El reactivo también puede ser útil para determinar el linaje de las células linfoides malignas en los casos de leucemia y linfoma crónicos y agudos, y la gran mayoría de las neoplasias malignas de células B expresan CD19¹⁻³.

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD19 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD19. Para identificar estas células se incubó 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)^{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 IgG2a	ICIGG2AF-100UG
PE		ICIGG2APE-50UG
APC		ICIGG2AA-50UG

- Centrífuga
- 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 CD19 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 CD19 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.

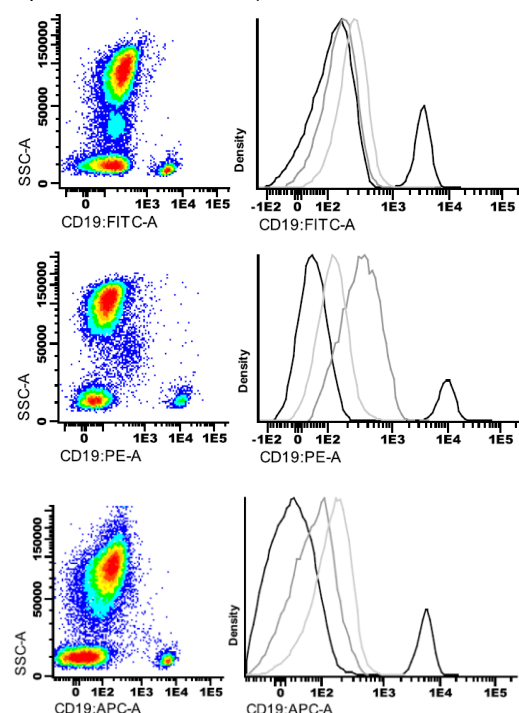


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de leucocitos marcados con CD19 y su complejidad interna (SSC). A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma.

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.

- 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 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.

CARACTERÍSTICAS

ESPECIFICIDAD

El CD19 se expresa desde las primeras etapas del desarrollo del progenitor B y en todas las células B periféricas, incluidas las células B del centro germinal, todas las líneas de células B y las leucemias de células B.

El antígeno se pierde en la maduración de las células B a las células plasmáticas.

CD19 se expresa en células de linfocitos B. 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 MAb para estudiar.

Las muestras de sangre obtenidas de donantes sanos normales de raza caucásica se marcaron con anticuerpo monoclonal de Immunostep CD19.

Se analizó la fluorescencia no específica identificada por un control de isotípico IgG2a. Las células contenidas en la región de las plaquetas, eritrocitos, monocitos y regiones de linfocitos T se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de marcaje de antígeno de superficie celular por citometría de flujo.

FITC			Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
	N	Validos	5	5	5
		Perdidos	0	0	0
	Media		5,49	6,24	4,22
	Mediana		5,18	7,12	4,29
	Moda		1,69 (a)	3,71(a)	1,94(a)
	Desviación estandar		3,94	2,32	1,93
	Varianza		15,52	5,41	3,75
	Rango		8,79	5,02	5,14

PE			Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
	N	Validos	10	10	10
		Perdidos	0	0	0
	Media		48,38	97,37	99,58
	Mediana		47,61	98,28	99,95
	Moda		30,67 (a)	88,95 (a)	99,99 (a)
	Desviación estandar		11,58	3,25	0,78
	Varianza		134,23	10,57	0,61
Rango		35,34	11,00	2,33	
APC			Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
	Rango	Validos	10	10	10
		Perdidos	0	0	0
	Media		13,43	8,81	0,38
	Mediana		11,16	7,63	0,35
	Moda		2,26(a)	3,13(a)	0,29(a)
	Desviación estandar		10,30	5,20	0,11
	Varianza		106,29	27,09	0,012
Rango		33,74	14,97	0,31	

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de Immunostep CD19 se determinó marcando una muestra de sangre de un donante. 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 determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado se llevaron a cabo pequeñas pero deliberadas variaciones. Este estudio, proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Modelo	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimación
FITC	0,983(a)	0,967	0,962	1,10648
PE	0,997 (a)	0,994	0,993	0,17612
APC	0,992(a)	0,984	0,982	0,08903

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados CD19 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD19 +, alto, medio y bajo.

Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD19.

De esta manera, la reproducibilidad se demostró a través de 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 CD19+.

Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD19 conocidas en

proporciones apropiadas, mientras se mantenía la misma concentración celular total para los tres rangos.

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

FITC	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación stdr.
Alto	10	12,70	13,63	13,14	0,29
Medio	10	6,92	7,76	7,44	0,27
Bajo	10	2,00	3,24	2,48	0,32
Validos N (lista)	10				
PE	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación stdr.
Alto	10	13,95	14,40	14,10	0,12
Medio	10	5,40	5,89	5,66	0,12
Bajo	10	0,33	0,77	0,52	0,11
Validos N (lista)	10				
APC	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación stdr.
Alto	10	14,17	14,84	14,39	0,19
Medio	10	4,37	4,84	4,58	0,16
Bajo	10	0,57	0,95	0,70	0,10
Validos N (lista)	10				

PRECISIÓN INTRALABORATORIO

Para determinar la repetibilidad 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 Linfocitos CD19+/CD45+.

		Promedio	Desv stdr promedio	promedio %CV
PE	% positiva	1,81	0,09	5,50
	IMF	8912,20	198,49	2,22
	Valido N (lista)	10	10	10
FITC	% positiva	3,77	0,14	3,87
	IMF	3953,50	108,24	2,73
	Valido N (lista)	10	10	10

Como se muestra en la tabla, los resultados muestran una excelente repetibilidad de lote a lote, tanto en porcentaje promedio de CV porcentuales de células positivas como en MFI como valores de demostración.

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 remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

1. Pilar María Hernández-Campo, Julia Almeida, María Luz Sánchez, Mariester Malvezzi, Alberto Orfao. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: A frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cytometry Part B: Clinical Cytometry Volume 70B Issue 2, Pages 71 – 81
2. Orfao, J. Almeida, M.L. Sánchez, F.M. Sánchez-Guijo, C. Vallejo, M.C. López-Berges, M.A. García-Marcos, M.J. Moro, J.F. San Miguel. Incidence of aberrant phenotypes in a large series of B-cell chronic lymphoproliferative disorders, implication for minimal residual disease.
3. Marta Martín-Ayuso, Julia Almeida, Martín Pérez-Andrés, Rebeca Cuello, Josefina Galende, María Isabel González-Fraile, Guillermo Martín-Núñez, Fernando Ortega, María Jesús Rodríguez, Jesús F. San Migueli, Alberto Orfao. Peripheral Blood Dendritic Cell Subsets from Patients with Monoclonal Gammopathies Show an Abnormal Distribution and Are Functionally Impaired. The Oncologist, Vol. 13, No. 1, 82-92, January 2008; doi:10.1634/theoncologist.2007-0127
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