

Anti- Humano CD45 (HI30)

Fluorocromo	Referencia	Test
OC515	45OC2-100T	100 test



DESCRIPCION DEL PRODUCTO

Otros nombres: LCA, T200

Descripción: el anticuerpo monoclonal anti-CD45 procede de la hibridación de células de mieloma y células de bazo de ratón inmunizado con células mononucleares de sangre periférica y de amígdalas humanas. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

Uso previsto: El CD45 conjugado con un fluorocromo es un reactivo de inmunofluorescencia directa de un solo color destinado a la identificación de células de línea linfocítica y mieloide, tanto en médula ósea como en sangre periférica de muestras normales y patológicas en un citómetro de flujo.

Clon: HI30

HLDA: El anticuerpo anti-CD45 clon HI30 fue incluido en el 4º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código N816¹

Isotipo: Ratón IgG1, kappa

Reactividad: Humano.

Fuente: Sobrenadante procedente de un cultivo invitro de células de un hibridoma celular o ascites de ratón.

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD45 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)
OC515	150 ug en 0,5 ml	300

USO PROPUESTO.

El CD45, clon HI30 de Immunostep, es un anticuerpo monoclonal destinado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de granulocitos en muestras humanas, células NK, linfocitos y macrófagos que expresan CD45 por citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

Este marcador puede ser utilizado por sí solo o en combinación con otros marcadores para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes, leucemias.

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD45 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD45. 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 2º-8º 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.
- En caso de background, centrifugar el producto a 2000 rpm durante 2 minutos para evitar interferencias.

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)^{2,3}. 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
OC515	Mouse IgG1	ICIGG10C-100UG

- 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 CD45 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 CD45 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 en sangre periférica de un donante sano.

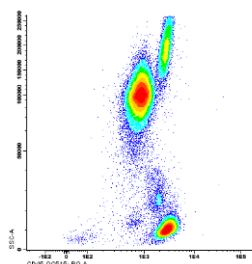


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de leucocitos CD45+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de donante sano.

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^{4,5,6}.

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 anticuerpo anti-CD45 clon HI30 fue incluido en el 4º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código N816¹.

El anticuerpo reconoce todas las isoformas de antígeno humano CD45 (Antígeno Común Leucocitario), una proteína de transmembrana de cadena simple tipo I expresada en nivel alto en todas las células de origen hematológico, excepto en eritrocitos y plaquetas.

Para analizar la especificidad analítica, realizamos un ensayo para determinar el porcentaje de marcaje de leucocitos, plaquetas y eritrocitos, identificando estas poblaciones con marcadores específicos de línea. El protocolo seguido es el de marcaje de antígenos de membrana con lisis de eritrocitos y lavado posterior.

El resultado se muestra en la siguiente tabla:

LINEALIDAD

Estadística descriptiva				
	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
% Leucocitos	99,80	99,99	99,9050	0,0675
% Plaquetas	0,00	0,17	0,0680	0,06125
% Eritrocitos	0,01	0,08	0,0370	,02497
Validos N	10			

Para el análisis de la linealidad se realizaron diferentes diluciones de una muestra de sangre periférica marcada con la misma muestra sin marcar manteniendo el número total de células constante. Se analizó la relación de los porcentajes esperados con los porcentajes obtenidos.

Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

R	R Cuadrado	Regresión lineal
0,996	0.933	Y=0,7957X + 24,27

REPETIBILIDAD

La repetibilidad⁹ del anticuerpo monoclonal CD45 clon HI30 fue determinada realizando 2 réplicas durante 20 días de una muestra control comercial CD-Chex Plus (Streck, ref. 213326) analizadas en un citómetro FACSAria III.

Para el cálculo de la repetibilidad se analizó el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Repetibilidad			
	Parámetro analizado	Desviación típica	% CV
OC515	IMF	17,32	1,98
	% células positivas	0,08516	0,08

REPRODUCIBILIDAD

Para demostrar la reproducibilidad y la precisión interlaboratorio, se analizaron 3 lotes diferentes del anticuerpo, durante 5 días seguidos analizando 2 réplicas de una muestra control comercial CD-Chex Plus (Streck, ref. 213326). Esto hace un total de 60 determinaciones para analizar la reproducibilidad del producto y su precisión entre lotes⁸. Las muestras fueron adquiridas en dos laboratorios diferentes.

Para el cálculo de la reproducibilidad se analizó el porcentaje de células positivas.

El resultado del análisis aparece mostrado en el siguiente cuadro:

	Precisión entre lotes		Precisión entre laboratorios		Precisión	
	Dev. típica	% CV	Dev. típica	% CV	Dev. típica	% CV
OC515	0,082	0,08	0,057	0,06	0,205	0,21

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

REFERENCIAS

1. Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, ed. Leucocyte Typing IV. New York, NY: Oxford University Press; 1989: 1-1182.
2. 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.

3. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
4. Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
5. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
6. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
7. Knapp W, Dorken B, Gilks W et al., eds. Leucocyte Typing IV. Oxford: Oxford University Press, 1989. Garland Publishing Inc.; 1997. p. 65-7.
8. Zola H, Swart B, Nicholson I, Voss E. Leukocyte and Stromal Cell Molecules. The CD Markers. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2007; :1-581.
9. CLSI EP05-A3. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition.

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