Reactivo de detección de CAR-T -Cell CD19

PE/FITC Proteína humana CD19

REF	Σ			
19-0212-25T	25 test	PE	5 µL/test	RUO
19-0212-100T	100 test	PE	5 µL/test	
19-0213-25T	25 test	FITC	5 µL/test	
19-0213-100T	100 test	FITC	5 µL/test	

1. USO PREVISTO

Identificación y cuantificación de células T CAR CD19 mediante citometría de flujo.

2. DESCRIPCIÓN

Fuente: proteína CD19 humana (20-291), etiqueta Fc, expresada a partir de células humanas 293 (HEK) y posteriormente conjugada con fluorocromo mediante una tecnología patentada (BrightStep).
Peso molecular: 56,6 kDa.
Purificación: cromatografía de afinidad.
Composición: proteína CD19 humana conjugada en una solución acuosa que contiene una proteína estabilizadora y azida sódica al 0,09 % (NaN_3).
Uso recomendado: el uso recomendado de este reactivo es de 5 µl para volúmenes de muestra de entre 100 µl (protocolo FACS). Recomendamos titular el reactivo para otros protocolos, como el protocolo de lisis masiva.

Acceso a la proteína:	CD19 (Pro 20 - Lys 291) P15391-1	Fc (Pro 100 - Lys 330) P01857

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Los reactivos para citometría de flujo desempeñan un papel crucial en la monitorización y evaluación de la eficacia de las terapias con células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR). Estas terapias representan un enfoque revolucionario en el tratamiento del cáncer, en el que las células T del paciente se modifican genéticamente para reconocer y atacar específicamente las células cancerosas. Sin embargo, para garantizar el éxito de estas terapias, es fundamental realizar un seguimiento minucioso de la persistencia y la actividad de las células T CAR en el organismo del paciente.

Los reactivos utilizados en la citometría de flujo son esenciales en este proceso. Su capacidad para proporcionar una identificación y cuantificación precisas de las células T CAR en muestras de sangre u otros tejidos, así como para evaluar su viabilidad y función. Esto es fundamental para determinar si las células T CAR persisten en el organismo del paciente en niveles suficientes para combatir eficazmente el cáncer y si mantienen su capacidad para reconocer y destruir las células cancerosas. La célula T CAR CD19 de Immunostep es un reactivo basado en antígenos que consiste en el dominio extracelular CD19 humano (20-291) conjugado con fluorocromo mediante una tecnología patentada (BrightStep™) que mejora la detección de las células T CAR.

4. PRINCIPIO DE LA METODOLOGÍA

El reactivo CD19 CAR T de Immunostep se ha desarrollado para la detección de células T transducidas que han sido diseñadas para expresar el receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de CD19 en la superficie celular mediante un protocolo de citometría de flujo por inmunofluorescencia directa.

5. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Almacenar refrigerado entre +2 y +8 °C. NO CONGELAR. El kit sin abrir es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial. No lo utilice después de esta fecha. Una vez abierto, los reactivos son estables si se conservan a una temperatura de entre +2 y +8 °C, protegidos de la luz y de la contaminación.

6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Solución salina tamponada (PBS) con azida sódica al 0,09 %. Se recomienda añadir BSA al 0,2 %.
- Solución lisante. (Ref. RBC10X-50M), solución concentrada 10X que contiene cloruro de amonio (NH_4 Cl). Para su uso, diluir la solución concentrada RBC Lysis Solution (1:10) (5 ml de RBC Lysis Solution 10X + 45 ml de agua destilada).
- Panel de anticuerpos para la identificación de células T CAR:

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	REF
OC515 Anti-CD45 humano FITC	45OC2-100T
Anti-CD3 humano	3FI-100T
PerCP-Cy5.5 Anti-CD4 hmano APC	4PP-100T
Anti-CD8 humano	8A1-100T
PE-Cyanine7 Anti-CD45RA humano	45RAPC7-100T

Tabla I: Anticuerpos que pueden utilizarse para la evaluación de las células CAR-T en la sangre periférica recomendación opcional).

7. RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

⚠ Debe evitarse la tinción conjunta con anticuerpos anti-CD19 humanos, ya que el reactivo de detección de células T CAR CD19 también puede ser reconocido por los anticuerpos CD19.

⚠ Antes de adquirir las muestras, es necesario asegurarse de que los ajustes del citómetro de flujo y su compensación sean adecuados.

⚠ Los reactivos contienen azida sódica. En condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazoico, un compuesto altamente tóxico. Los compuestos de azida deben disolverse con agua del grifo antes de su eliminación. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías. La ficha de datos de seguridad (MSDS) está disponible en el sitio web *www.immunostep.com.*

⚠ Mantenga los componentes del kit alejados de la exposición directa a la luz durante el protocolo. Los reactivos conjugados son sensibles a la luz.

⚠ Utilice equipo de protección personal para manipular las muestras. Lávese las manos adecuadamente después de manipulación de muestras. Todos los procedimientos deben realizarse de acuerdo con las normas de seguridad aprobadas.

8. RECOGIDA DE MUESTRAS

La extracción de muestras de sangre debe realizarse en tubos de recogida de sangre utilizando el anticoagulante adecuado (EDTA o heparina). Para obtener resultados óptimos, la muestra debe procesarse durante las seis horas siguientes a la extracción. Se recomienda desechar las muestras que no puedan procesarse en las 48 horas siguientes a la extracción.

9. PROTOCOLO

9.1 Protocolo de lisis FACS

Protocolo para la tinción inmunofluorescente. El protocolo puede llevarse a cabo en un tubo citométrico (12 x 75 mm) (ANEXO I):

1. Prepare una mezcla de tinción que contenga el volumen indicado en el vial del reactivo CD19 CAR T-Cell (CD19p) y anticuerpos conjugados adicionales. Véanse los ejemplos de la tabla 1. Para más detalles, consulte las respectivas fichas técnicas.
2. Añada 100 µl de muestra (hasta 10^6 células) y mezcle adecuadamente en el vórtex.
3. Incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) o durante 60 minutos a 4 °C.
4. Añada 2 ml de la solución de lisis, mezcle en el vórtex e incube en la oscuridad durante 10-15 minutos.
5. Centrifugar a 540 g durante 5 minutos y retirar con cuidado el sobrenadante por aspiración, sin tocar el sedimento celular. Dejar 50 µl de líquido sin aspirar para facilitar la resuspensión del sedimento.
6. Añada 2 ml de PBS (consulte los materiales necesarios pero no proporcionados).
7. Centrifugar a 540 g durante 5 minutos y retirar con cuidado el sobrenadante por aspiración, sin tocar el sedimento celular. Dejar 50 µl de líquido no aspirado.
8. Resuspender el sedimento en 0,3 ml de PBS.
9. Adquirir en un citómetro de flujo o almacenar en la oscuridad a 2 °C -8 °C hasta que se realice el análisis.

Realización. Las muestras deben obtenerse en el plazo de 1 hora tras la lisi.

10. ESTRATEGIA DE ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE ENSAYOS CITOMÉTRICOS

En la citometría de flujo multicolor es esencial corregir el desbordamiento de fluorescencia.

Establezca sus propios procedimientos para verificar que la compensación es adecuada para su panel de anticuerpos.

10.1 Estrategia para el análisis de muestras

Se recomienda como primer paso cribar la población de células nucleadas en el patrón FSC-H/FSC-A para eliminar los restos residuales y reducir el fondo, seguido de la selección de las células nucleadas. En el diagrama de puntos SSC-A/FSC-A para eliminar los dobletes, lo que permite la identificación correcta de la población de linfocitos (A).

En un diagrama de puntos para la siguiente selección CD45/CD3 (B), para la selección de la población de linfocitos T. Por último, en un diagrama de puntos para el marcador de células T CAR (reactivo CD19 CAR T-Cell), para la selección de células T CAR. En este diagrama de puntos, CD45RA solo se utiliza para definir con mayor precisión la selección de la población de células T CAR.

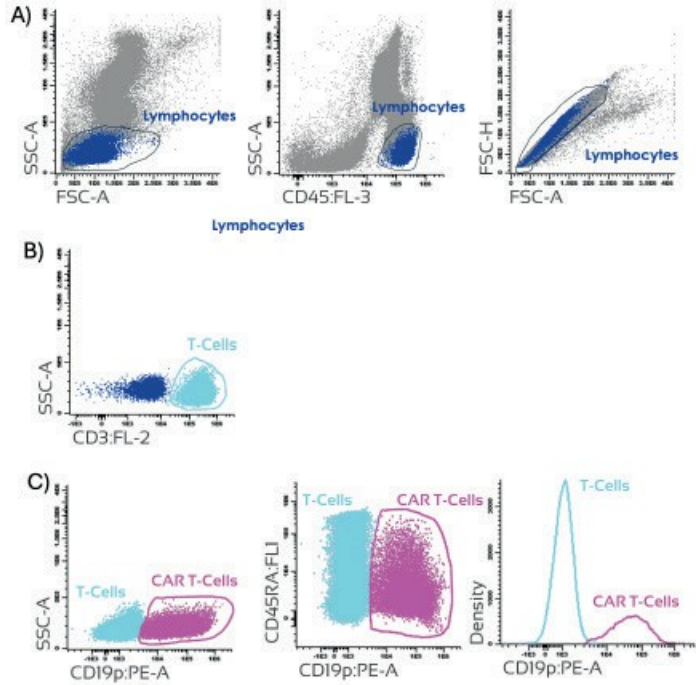


Figura I: Estrategia de análisis para la selección de la población de células T CAR en los diagramas de puntos FSC-H/FSC-A (A); SSC o CD45/CD3 (B) y pCD19 (C).

11. GARANTÍA

Se garantiza únicamente la conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta o en el etiquetado del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia por la presente a otras garantías.

La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

12. INFORMACIÓN ADICIONAL

Solo para uso en investigación. No apto para uso diagnóstico.

No apto para la reventa. Immunostep no se hace responsable de las infracciones que puedan producirse con el uso de este producto. Queda estrictamente prohibido cualquier uso de este producto que no sea el especificado en este documento.

A menos que Immunostep indique lo contrario mediante autorización por escrito, este producto está destinado exclusivamente a la investigación y no debe utilizarse para ningún otro fin, incluidos, entre otros, fines diagnósticos, terapéuticos o comerciales en seres humanos o animales. Para obtener más información, consulte el servicio de asistencia técnica de www.immunostep.com.

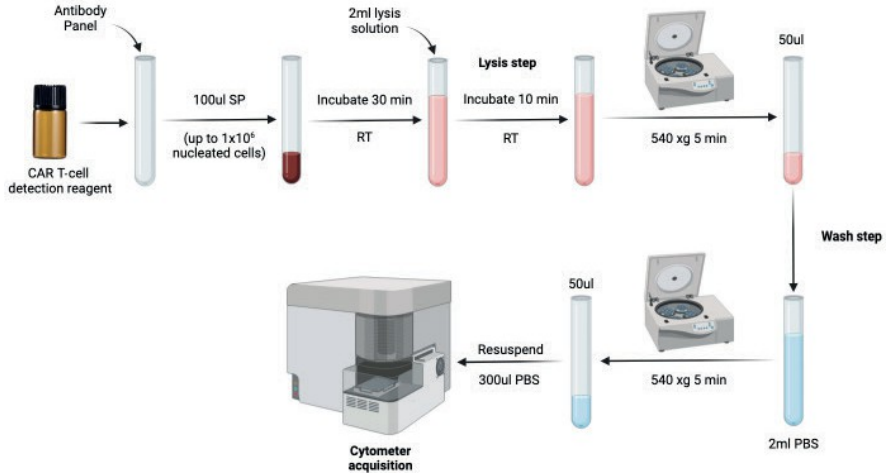
13. EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	Fluorocromo
REF	Referencia de productol
Σ	Contenido para análisis <n>
	Estado normativo
RUO	Solo para uso en investigación
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
	Siga las instrucciones de uso.
	Conservación entre x °C y y °C.
	Preste atención a
	Contenido de cada prueba
	Fabricante

14. DATOS DEL FABRICANTE

IMMUNOSTEP S.L.
Dirección: Avda. Universidad de Coimbra, s/n Centro de Investigación Oncológica (C.I.C) Campus de Unamuno 37007 Salamanca (España)

Telf./fax: (+34) 923 294 827
Correo electrónico: info@immunostep.com

www.immunostep.com

ANEXO I. Protocolo para la tinción inmunofluorescente