Stem Cell Kit

Referencia	Test
SCK	50 test
SCK2	50 test

RUO

we know how
immunostep

INTRODUCCIÓN

El Stem Cell Kit está diseñado para la determinación cuantitativa de las células hematopoyéticas stem (en inglés hematopoietic stem cells, HSCs) positivas para CD34, debido a la especificidad de los siguientes anticuerpos que componen el kit:

- El anticuerpo monoclonal anti-CD45 que reconoce al receptor tipo C de la proteína tirosina fosfatasa, una proteína de 220 kD. miembro de la familia antígenos leucocitarios (HLA).

- El anticuerpo monoclonal CD34 que reconoce el antígeno proteico progenitor de células hematopoyéticas CD34, una glicoproteína de membrana tipo I monomérica de 110 kD[13,14]., presente en células precursoras hematopoyéticos inmaduras de la médula ósea[17] y la sangre además de sangre del endotelio capilar de muchos tejidos[15,16].

MATERIAL SUMINISTRADO

El Stem Cell kit referencia SCK, incluye un vial de CD45/CD34, un vial de CD45/Control Isotípico IgG1, tubos con esferas de recuento absoluto, un vial de 7-Amino Actinomicina D (7-AAD) y un bote de solución de lisis 10X.

- Vial A: 1 ml a 20 µl/test. El vial está formado por una mezcla de los anticuerpos monoclonales de origen murino CD45 y CD34 en una solución acuosa que contiene una proteína estabilizante y azida sódicoa (NaN_3) al 0.09%

- Vial B: 1 ml a 20 µl/test. El vial está formado por una mezcla de los anticuerpos monoclonales de origen murino CD45 y el control isotípico IgG1 en una solución acuosa que contiene una proteína estabilizante y azida sódica (NaN_3) al 0.09%

- Tubos de recuento absoluto StepCount (100): son tubos que contienen un número conocido de microesferas (el número de esferas aparece en el tubo) de 4,2 micras de diámetro liofilizadas, capaces de emitir fluorescencia, para ser usadas en el citómetro de flujo.

- Vial de 7-AAD: El vial va a 5 µl y lleva 500 µL para 100 test, contiene 7-Amino-Actinomicina D en estado líquido y azida sódica (NaN_3) al 0,09%, para identificar las células no viables.

- Bote con solución de lisys al 10X (10 ML): el bote contiene una solución líquida basada en cloruro de amonio (NH_4Cl) concentrada 10 veces, para lisar los eritrocitos de la muestra, y azida sódica (NaN_3) al 0,09%.

El Stem Cell kit referencia SCK2, incluye un vial de CD45/CD34 tubos con esferas de recuento absoluto, un vial de 7-Amino Actinomicina D (7-AAD) y un bote de solución de lisis 10X.

- Vial A: 1 ml a 20 µl/test. El vial está formado por una mezcla de los anticuerpos monoclonales de origen murino CD45 y CD34 en una solución acuosa que contiene una proteína estabilizante y azida sódica (NaN_3) al 0.09%

- Tubos de recuento absoluto StepCount (50): son tubos que contienen un número conocido de microesferas (el número de esferas aparece en el tubo) de 4,2 micras de diámetro liofilizadas, capaces de emitir fluorescencia, para ser usadas en el citómetro de flujo.

- Vial de 7-AAD: El vial va a 5 µl y lleva 250 µL para 50 test, contiene 7-Amino-Actinomicina D en estado líquido y azida sódica (NaN_3) al 0,09%, para identificar las células no viables.

- Bote con solución de lisys al 10X (10 ML): el bote contiene una solución líquida basada en cloruro de amonio (NH_4Cl) concentrada 10 veces, para lisar los eritrocitos de la muestra, y azida sódica (NaN_3) al 0,09%

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Centrifuga
- Micropipetas para dispensar volumenes entre 5 µL y 2 mL.
- Tubos de recolección de sangre con anticuagulante.
- Buffer de fosfato salino (PBS) con el 0,09% de azida sódica. Es recomendable que incluya el 0,5% de albúmina de suero bovina (BSA).
- Sistema de vacio
- Citómetro de flujo equidapo con el láser y filtros para los fluorocromos del kit.
- Agitador tipo Vortex.

USO RECOMENDADO

El Stem Cell Kit de Immunostep ha sido diseñado para determinar el porcentaje y número absoluto de células CD34+/CD45+ en células viables en un citómetro de flujo. Además (sólo con la referencia SCK), podemos cuantificar el número de falsos positivos por marcaje inespecífico, usando el vial CD45/Control isotípico IgG1,

Con este kit, es posible analizar cualquier muestra, incluyendo sangre periférica, médula ósea, sangre movilizada, productos de leucaféresis y sangre de cordón umbilical, siempre que se realice la dilución adecuada.

RELEVACIA CLÍNICA

La enumeración de las células madre hematopoyéticas (CMH) CD34 tiene gran importancia en trasplantes tanto autólogos como alogénicos.

De la misma forma, las células CMH CD34 son ampliamente utilizadas en tratamientos de enfermedades hematológicas, tumores sólidos y enfermedades autoinmunes.

El éxito de una recuperación hematopoyética rápida es totalmente dependiente del número de células CD34 reinfundidas.

PRINCIPIO DEL TEST

El kit permite la identificación y cuantificación de células CD34 positivas, correlacionando el número de estas con el de un número conocido de esferas. En el proceso, se puede discriminar entre células viables y células no viables eliminando además (sólo con la referencia SCK) los falsos positivos por unión inespecífica gracias a la incorporación en el kit de un control isotípico de ratón IgG1.

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 abiertos los viales de anticuerpos que componen el kit del producto son estables 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

Para los viales de anticuerpos, 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. ⚠

a) Los viales de los componentes del kit 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. Ficha de datos de seguridad (FDS) disponible en la web *www.immunostep.com*
b) Evitar contaminación microbiana del reactivo.
c) Debe evitarse la exposición a la luz. Use luz tenue durante la manipulación, incubación con células y antes del análisis.
d) No pipetear con la boca.
e) En el caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.
f) Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.
g) No usar después de la fecha de caducidad establecida en el vial.
h) Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis.
i) PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
j) Sólo para uso profesional.
k) Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.

RECOGIDA DE MUESTRAS.

La extracción de muestras debe hacerse en tubos de recolección adecuados, usando el anticoagulante apropiado (EDTA, ACD-A, CPD 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.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

1. Es recomendable hacer un recuento de células totales antes de proceder al ensayo. Si el número de células es superior a 50 x 10^3 células/µl debemos hacer una dilución con PBS/BSA (ver materiales requeridos pero no suministrados) para que la concentración celular quede por debajo (recordar anotar la dilución).
2. Marcar dos tubos Stepcount como se describe a continuación:
   - Tubo N°1: CD45/CD34/7-AAD
   - Tubo N°2 (solo con la referencia SCK): CD45/Isotype Control/7-ADD
3. Añadir 20 µl de reactivo A: CD45 FITC / CD34 PE en el N°1 tubo. Pipetear 20 µl de reactivo B (sólo con la referencia SCK2): CD45 FITC / control de isotipo PE en el N°2. No tocar el sedimento de esferas.
4. Añadir 5 µl de 7-AAD a cada uno de los tubos.
5. Añadir la muestra en cada tubo y mezclar adecuadamente en el vortex. El volumen recomendable es entre 20 y 100 µl (anotar el volumen).
6. Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C) durante 15 minutos o a 4° C durante 30 minutos.
7. Añadir 0,45 ml de la solución de lisis 1X de Cloruro de amonio (NH_4Cl) en cada tubo. Agitar en el vortex e incubar en oscuridad durante 10 minutos o hasta que la muestra esté lisada.

Adquirir en un citometro de flujo o almacenar a 2-8° C en oscuridad hasta el análisis. Las muestras deben ser adquiridas durante la hora siguiente a la lisis.

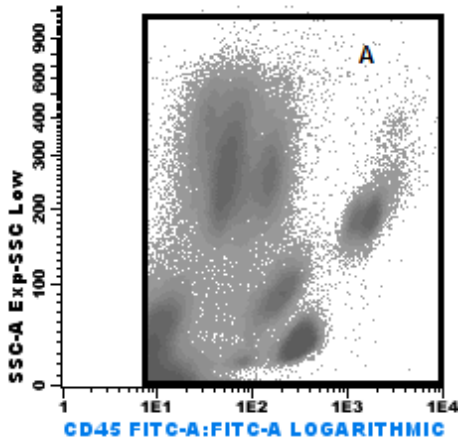
ADQUISICIÓN Y ANALISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Antes de adquirir las muestras, verificar que el citómetro está alineado correctamente y estandarizado para dispersión de luz. Los parámetros FSC y SSC deben estar fijados en la amplificación lineal mientras que la intensidad de fluorescencia (parámetros FL1, FL2, FL3 FL4...) deben ser ajustados en la amplificación logarítmica.
La compensación de la fluorescencia se ha establecido siguiendo las instrucciones del fabricante del citómetro.

Antes de adquirir las muestras, ajustar al mínimo el umbral o discriminador en el parámetro FSC para minimizar los residuos y garantizar que la población de interés quedará incluida en el análisis.

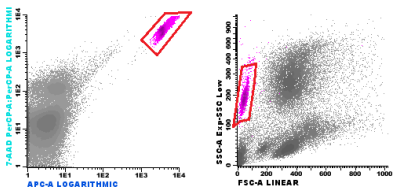
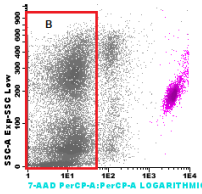
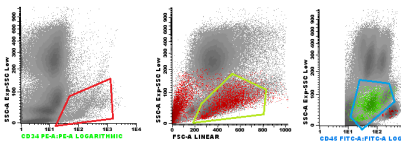
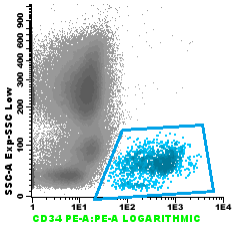
Antes de adquirir en el citómetro de flujo, se recomienda agitar manualmente y de manera suave las muestras para garantizar la resuspensión completa de las células y microesferas.

Establecer en el citómetro la región A tal y como se muestra en la imagen, para que sólo almacene los eventos de esta región durante la adquisición:



Adquirir y analizar toda la muestra posible del tubo. Es recomendable adquirir a velocidad baja o media para evitar la formación de agregados celulares. Si no se va a adquirir toda la muestra es recomendable parar cada 4 minutos, agitar el tubo manualmente y seguir con la adquisición.

Ejemplo de análisis:

ETAPA	IMAGEN
Etapa 1: selección de la población de microesferas	
Etapa 2: selección de la población de células viables (región B)	
Etapa 3: utilizando la población de la región B (células viables), identificar las células CD34+	
Etapa 4: Anotar el número y porcentaje de las células CD34+	
Etapa 5: calcular el número absoluto de las células CD34	Número absoluto de células CD34 (células/µl) = (Nº de eventos absolutos en la población CD34 / Nº de eventos en absolutos en la región de esferas) x (Nº de esferas (indicado en el tubo) / Volumen de muestra usada)

El número absoluto de la población de células CD34+ se determinó dividiendo el número absoluto de células CD34+ adquiridos por el número de esferas adquiridas, y multiplicando este resultado por la concentración de microesferas (concentración de microesferas está indicado en la etiqueta de la tubo) partido por el volumen de muestra usada. Si hemos realizado alguna dilución, el número final debe ser multiplicado por la dilución llevada a cabo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La incubación de los anticuerpos 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

Anti CD34 clon 581, se incluyó en el 5° Taller Internacionales sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos, código WS MA27[6].

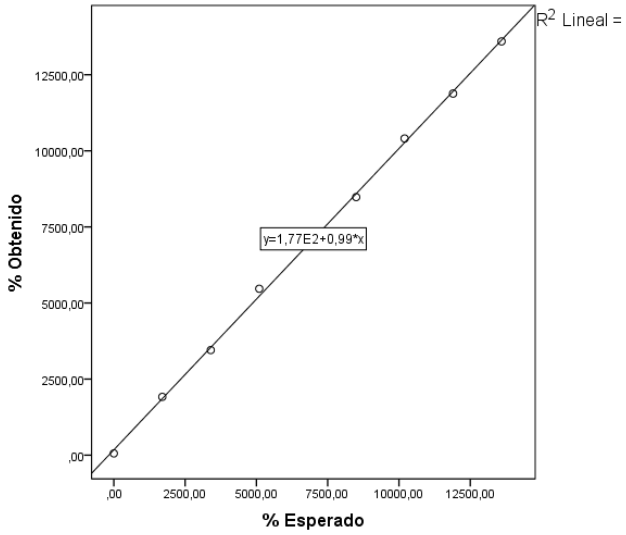
El anticuerpo anti-CD45 clon HI30 fue incluido en el 4° taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código N8161[12].

INTERFERENTES

No deberían ser usadas muestras coaguladas, fijadas

Análisis estadístico

R	R cuadrado	Error típico de la estimación	Linea de regresión
1,000[a]	,999	142,9315	Y= 0,990x + 176,71



o con gran cantidad de hemolisis.

LINEARIDAD

Para el análisis de la linearidad se realizaron diferentes diluciones de una población positiva (células 293T transfectadas con CD34, ref. H34LYS) y una población negativa (células de la línea 293T sin transfectar) manteniendo el número total de células constante y se analizó la correlación entre los porcentajes esperados y los porcentajes obtenidos[8].

Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

REPETIBILIDAD y PRECISIÓN ENTRE LABORATORIOS

La repetibilidad del Stem Cell Kit fue determinada analizando 3 muestras control comerciales con diferentes niveles de CMH de valores similares a sangre periférica normal (Low), médula ósea (Medium) y sangre de cordón o sangre movilizada (High), realizando análisis en dos laboratorios diferentes con diferentes equipos (FACS Calibur y FACS Aria II) y técnicos, durante un periodo de 20 días[7].
* CD-Chex CD34, Streck

Los resultados obtenidos para cada laboratorio se muestran a continuación:

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
Resultado global (Overall result)	Low		Medium		High	
N	50		50		50	
Valor medio (Mean value)	0,067		0,895		2,851	
	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Interserial (Between-lab)	1,0079	13,43%	5,7253	9,67%	6,9357	3,85%
Interdía (Between-day)	0,3755	5,00%	2,5918	4,38%	1,4463	0,80%
Intra-laboratorio (Whitin-lab)	1,0755	14,33%	6,2846	10,61%	7,0849	3,93%

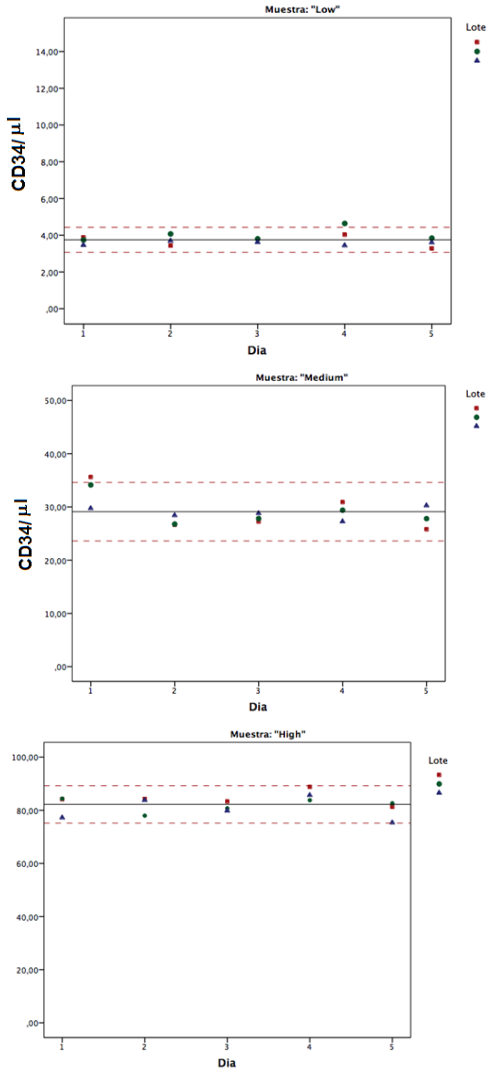
SD: Desviación Estándar
CV: Coeficiente de Variación

REPRODUCIBILIDAD ENTRE LOTES

Para demostrar la reproducibilidad entre lotes, se marcaron 3 muestras controles con diferentes niveles de CMH CD34+, de valores similares a sangre periférica normal "Low", médula ósea "Medium*" y sangre de cordón o sangre movilizada "High*", realizando análisis con tres lotes diferentes durante 5 días no consecutivos[7].

*CD-Chex CD34, Streck

A continuación se muestran los resultados para cada muestra:



El resultado del análisis aparece mostrado en el siguiente cuadro:

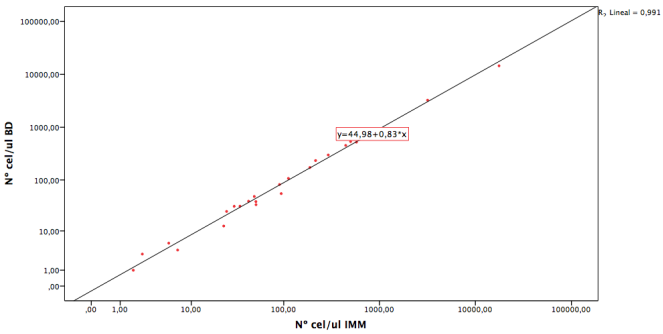
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
Resultado global (Overall result)	High		Medium		Low	
N	50		50		50	
Valor medio (Mean value)	0,067		0,895		2,851	
	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Interserial (Between-Bath)	4,4675	6,45%	5,7253	23,31%	0,3376	14,35%

COMPARACIÓN DEL SISTEMA DE MEDIDA

Para determinar la concordancia de los resultados se realizó una comparativa del procedimiento de medida[9] con un kit de referencia* en muestras de médula ósea de pacientes sanos y enfermos, analizando el número absoluto de células CD34+.

La siguiente tabla muestra el análisis de los resultados y la exactitud del kit Stem Cell Kit de Immunostep con respecto del kit de referencia*, en un intervalo de confianza del 95% (IC) dividido por intervalos en: bajo >10, medio entre 10 y 100 y alto >100 células por microlitro.

A continuación representamos en forma de recta de regresión los datos obtenidos:



Análisis estadístico

R	R cuadrado	Error típico de la estimación	Linea de regresión
0,999	,998	133,97930	Y= 0,83x + 44,98

* Becton Dickinson BD™ Stem Cell Enumeration Kit Catálogo No. 344563

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. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. J Hematother. 1996;5(3):213–226. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.213.

2. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. Cytometry. 1998;34(2):61–70.

3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: CLSI; 2014.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Linearity of Quantitative Measurement Procedures. Second Edition. CLSI guideline EP06-Ed2. Wayne, PA: CLSI; 2020.

5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP09-A3. Wayne, PA: CLSI; 2013.

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	CE etiquetado
IVD	*In vitro* dispositivo de diagnóstico
	Fabricado
	Presta atención a