

Anti- Humano CD34 (581)

Fluorocromo	Referencia	Test
PE	34PE-100T	100 test
APC	34A-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

Otros nombres:

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD34 deriva de células CD34 humanas.

Clon: 581

Isotipo: Ratón IgG1, kappa

HLDA: V, WS Code MA27

Reactividad: Humano.

Fuente: Sobrenadante procedente de un cultivo invitro de células de un hibridoma celular

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 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)
PE (R-Phycoerythrin)	25 ug en 2 ml	12,5
APC (Allophycocyanin)	30 ug en 2 ml	15

USO RECOMENDADO

El CD34 de Immunostep, el clon 581, es un anticuerpo monoclonal diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de células madre y progenitoras linfohematopoyéticas tempranas mediante citometría de flujo.

CLINICAL RELEVANCE

La densidad del antígeno CD34 es más alta en las células progenitoras hematopoyéticas tempranas y disminuye a medida que las células maduran. El antígeno está ausente en células hematopoyéticas completamente diferenciadas.⁽¹⁻⁵⁾

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD34 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD34. Para identificar estas células se incubaba 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)^{6,7}. 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
PE	Ratón IgG1	ICIGGIPE-50
APC		ICIGGIA-50

- 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 DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Recolectar la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD34 y determinar el porcentaje de células marcadas. Es necesario usar un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que la del CD34, para evaluar y corregir la unión no específica de los linfocitos (consulte los materiales requeridos pero no suministrados). Establezca una región de análisis para eliminar el ruido de fondo de fluorescencia e incluir las células marcadas positivamente.

A continuación se muestra un diagrama de ejemplo del marcaje de sangre periférica:

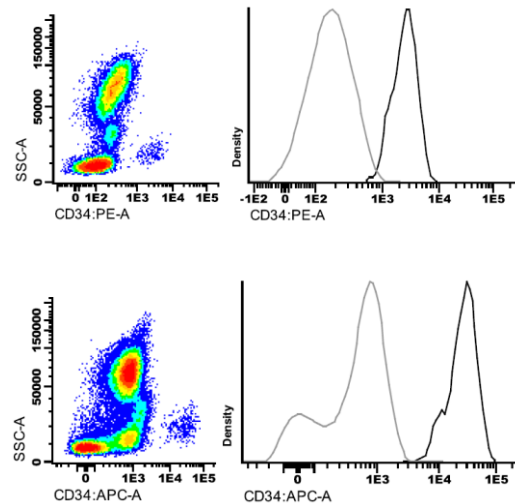


Fig. 1: a la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de linfocitos CD34 + y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

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^{8,9,10}.

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 clon 581 se incluyó en los quintos talleres internacionales sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, código W5 MA27.

El antígeno CD34 está presente en células precursoras hematopoyéticas inmaduras y en todas las células hematopoyéticas formadoras de colonias en la médula ósea y la sangre, incluidos los progenitores unipotentes y pluripotentes. El antígeno CD34 está presente en las células mieloides tempranas que expresan el antígeno CD33 pero carecen de los antígenos CD14 y CD15 y en las células eritroides tempranas que expresan el antígeno CD71 y expresan débilmente el antígeno CD45. El antígeno CD34 también se encuentra en las células endoteliales capilares y en aproximadamente el 1% de los timocitos humanos. Los linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas normales de la sangre periférica no expresan el antígeno CD34.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal CD34 se determinó marcando como positivo un CD34 humano activando células 293T y como negativo la misma línea sin activación. 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.

Este estudio se realiza 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.

Los resultados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada. La sensibilidad de CD34 se demostró de 1×10^5 a 1×10^6 células en 1×10^6 células totales.

Resumen del modelo				
Modelo	R ²	R ² ajustada	Error std. de la estimación	Regression lineal
PE	,985	,983	4,52684	$y = 0,897x - 1,697$
APC	,985	,983	4,52684	$y = 0,897x - 1,697$

a. Predictores: (Constante), % Esperados

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del anticuerpo monoclonal conjugado de Immunostep CD34 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de linfocitos; Alto, medio y bajo. Así, se realizaron un total de 30 determinaciones. 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 linfocitos CD19 + 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 tres donantes diferentes que expresan un porcentaje alto, medio y bajo de linfocitos.

Estadística descriptiva						
Porcentaje		N	Minimo	Maximo	Media	Desviación std.
Altos	Resultado	10	76,2	79,23	77,805	0,95003
	Validos N (lista)	10				
Medios	Resultado	10	51,69	60,26	56,745	2,74539
	Validos N (lista)	10				
Bajos	Resultado	10	3,95	15,98	8,361	3,31537
	Validos N (lista)	10				

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. Nishio H, Tada J, Hashiyama M, Hirn J, Ingles-Esteve J, Suda T. MC7. CD34 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 974-84, and p. 1134.
3. Civin CI, Trischmann TM, Fackler MJ, Bernstein ID, Bühring HJ, Campos L, et al. M7.1. Report on the CD34 cluster workshop. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 818-25.
4. Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. The hemopoietic stem cell antigen, CD34, is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukaemia* 1989;3:773-6.
5. Höffkes H-G, Lowe JA, Pedersen RO, Schmidkte G, McDonald DF. BIRMA-K3, a new monoclonal antibody for CD34 immunophenotyping and stem and progenitor cell assay. *J Hematotherapy* 1996;5:261-70.
6. 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.
7. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
8. 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.
9. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
10. 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