

# Anti-Humano CD33 (HIM3-4)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	33F-100T	100 test
PE	33PE-100T	100 test



## DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

**Otros nombres:** Myeloid cell surface antigen CD33, Sialic acid-binding Ig-like lectin 3, Siglec-3, gp67, p67  
**Descripción:** el anticuerpo monoclonal CD33 de Immunostep deriva de la línea celular KG1a.

**Clon:** HIM3-4

**Isotipo:** Ratón IgG1, kappa

**HLDA:** El clon HIM3-4 se incluyó en los quintos talleres internacionales sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, código WS MA12

**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-CD33 humano conjugado con un fluorocromo y en solución acuosa que contiene proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica (NaN<sub>3</sub>).

Fluorocromo	Reactivo suministrado	Concentración (µg/ml)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	200 ug en 2 ml	100
PE (R-Phycoerythrin)	50 ug en 2 ml	25

## USO RECOMENDADO

El CD33 clon HIM3-4 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de leucocitos de muestras humanas que expresen CD33 por citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLINICA

El antígeno CD33 es un marcador útil para el diagnóstico de células de leucemia no linfoides. El antígeno CD33 se expresa antes en el citoplasma (cyCD33) que en la membrana celular (mCD33) de los mieloblastos. Es más valioso usar cyCD33 y cyCD13 para diagnosticar la leucemia de AML-MO, ya que el antígeno CD13 también se expresa antes en el citoplasma (cyCD13) que en la membrana celular (mCD13) de los mieloblastos. <sup>(1-5)</sup>

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD33 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD33. 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](mailto: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](http://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)<sup>67</sup>. 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 IgG1	ICIGGIF-100UG
PE	Ratón IgG1	ICIGGPE-50UG

- 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 10<sup>6</sup> 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.

## FLOW CYTOMETRY ANALYSIS

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD33 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 CD33 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.

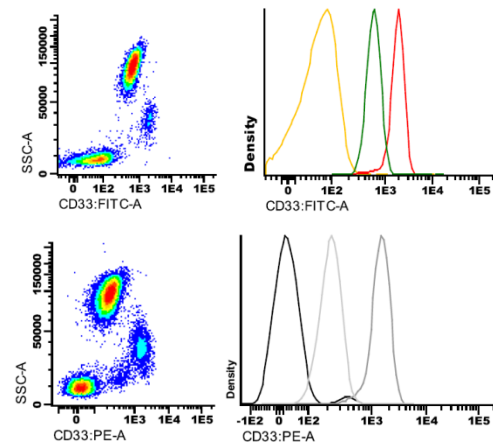


Fig. 1 A la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de linfocitos CD33 + y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

## 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.

- 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<sup>8,9,10</sup>.

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 HIM3-4 se incluyó en los quintos talleres internacionales sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, código WS MA112.

CD33 se expresa en células mielomonocíticas. 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 normales sanos caucásicos se marcaron con el anticuerpo monoclonal Immunostep CD33. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos, granulocitos, plaquetas y eritrocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de inmunofluorescencia directa para citometría de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Descriptive Statistics					
FITC					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
% Isotype control	10	,01	,91	,2000	,31045
% T lymphocytes	10	,00	,04	,0070	,01252
% B lymphocytes	10	,00	,03	,0070	,00949
% Granulocytes	10	,01	1,28	,2420	,40458
% Platelets	10	,03	,26	,1130	,07273
% Erythrocytes	10	,02	,10	,0560	,02797
Valid N (listwise)	10				
PE					
% Isotype control	10	,00	,53	,1840	,19699
% Platelets	10	,04	,45	,2380	,14711
% T Lymphocyte	10	,00	,12	,0360	,04551
% Erythrocytes	10	,01	,46	,1660	,14645
% B Lymphocyte	10	,00	,03	,0070	,00949
Valid N (listwise)	10				

#### SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal Immunostep CD33 se determinó marcando una línea celular positiva (U937) y una línea celular negativa (Jurkat). Las células se mezclaron en diferentes proporciones con un número final constante de 5X10<sup>6</sup> células para lograr diferentes relaciones celulares de 0% de células positivas a 100%.

A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo de acuerdo con la cantidad recomendada y 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.

Esto se realiza para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas variaciones (pero deliberadas), esto proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Resumen del modelo <sup>b</sup>					
	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustada	Error std. de la estimación	Regresión lineal
FITC	,998 <sup>a</sup>	,0996	,996	2,36546	y = 1,029x - 0,190
PE	,996 <sup>a</sup>	,993	,992	3,09025	y = 1,000x + 1,965

a. Predictores: (Constante), % esperados  
b. variable Dependiente % Obtenidos

#### REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados CD33 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada muestra en cada uno de los tres rangos de leucocitos: alto, medio y bajo. Se utilizaron tres muestras de cada rango. Así, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada tipo de rango. De este modo se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición.

Las 30 determinaciones para cada rango se realizaron mediante la tinción, el procesamiento y el análisis de 3 muestras separadas. Los monocitos CD33+ se seleccionaron para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada medida.

Para realizar este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de donantes normales que expresan un porcentaje diferente de leucocitos.

Descriptive Statistics					
FITC					
Range	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
High	10	8,67	9,81	9,059	0,3822
Medium	10	5,48	6,13	5,757	0,2032
Low	10	4,93	5,55	5,256	0,21732
PE					
High	10	6,18	6,883	6,529	0,208
Medium	10	5,086	5,77	5,423	0,221
Low	10	6,18	6,883	6,529	0,208

### EXACTITUD o REPETIBILIDAD

Para determinar la repetibilidad del marcaje con este producto, se marcaron 10 muestras diferentes con 3 lotes diferentes de este reactivo. Para cada muestra se obtuvieron tres valores diferentes de la intensidad de fluorescencia media (MFI) y el porcentaje de células positivas. Se calcularon la media de desviación estándar y la media del FMI de diez resultados obtenidos. Los resultados del análisis se muestran en el siguiente cuadro:

	Promedio	Promedio desviación str.	Pooled %CV
FITC			
% positivas	5,5869	0,3349	5,99
IMF	71,029	5,5869	7,86
PE			
% positivas	5,1625	0,1591	3,0005
IMF	2896,7500	220,2638	7,2681
Validos N (lista)	30	30	30

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.

*\*Nota: datos analizados con SPSS para Windows 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 remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

### **REFERENCIAS**

1. Ana B Pérez-Oliva, María Martínez-Esparza, José J Vicente-Fernández, Rubén Corral-San Miguel, Pilar García-Peñarribal, and Trinidad Hernández-Caselles. Epitope mapping, expression and post-translational modifications of two isoforms of CD33 (CD33M and CD33m) on lymphoid and myeloid human cell. *Glycobiology* (2011) 21 (6): 757-770.
2. Melissa G Lechner, Carolina Megiel, Sarah M Russell, Brigid Bingham, Nicholas Arger, Tammy Woo and Alan L Epstein. Functional characterization of human Cd33+ And Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *Journal of Translational Medicine* 2011, 9:90
3. B Brichard, I Varis, D Latinne, V Deneys, M de Bruyere, P Leveugle and G Cornu. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood monocytes. *Bone Marrow Transplantation* (2001) 27, 1081-1086.
4. Dzung H. Nguyen, Nancy Hurtado-Ziola, Pascal Gagneux, and Ajit Vark. Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *PNAS*, May 16, 2006, vol. 103, no. 20, 7765-7770
5. Dennis Sgroi, Aaron Nocks and Ivan Stamenkovic. A Single N-linked Glycosylation Site Is Implicated in the Regulation of Ligand Recognition by the I-type Lectins CD22 and CD33. August 2, 1996 *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 18803-18809.
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. 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](http://www.immunostep.com)