

Anti-Humano CD11b (DCIS1-18)

Fluorocromo	Referencia	Test
PE	I1BPE-100T	100 test
APC	I1BA-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Otros nombres: Integrin alpha-M; Ly-40; Mac-1a; Mac-1 alpha; CR3A; CR-3 alpha chain

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD11b deriva de esplenocitos C57BL / 10

Clon: DCIS1-18

Isotipo: Ratón IgG2a, kappa

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-CD11b 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)	100 ug en 2 ml	50
APC (Allophycocyanin)	100 ug en 2 ml	50

USO PROPUESTO.

El CD11b de Immunostep, el clon DCIS1 / 18, es un anticuerpo monoclonal diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de leucocitos de muestras humanas que expresan CD11b mediante citometría de flujo

RELEVANCIA CLÍNICA

La molécula de adhesión CD11b, se asocia con la integrina beta2 para formar el complejo Mac-1, y se expresa en leucemias monocíticas así como en otras leucemias mieloides. Se ha confirmado que su expresión en las células leucémicas se correlaciona con un curso más agresivo en pacientes adultos con AML5. El CD11b es un marcador residual mínimo específico de la enfermedad en la leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras⁵. La expresión de CD11b tiene implicaciones considerables para el pronóstico, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección de MRD en PBC-ALL infantil.

El lupus eritematoso sistémico (SLEB6) es un trastorno multisistémico crónico, recurrente, inflamatorio y, a menudo febril, del tejido conjuntivo, caracterizado principalmente por la participación de la piel, las articulaciones, los riñones y las membranas serosas. Es de etiología desconocida, pero se cree que representa una falla de los mecanismos reguladores del sistema autoinmune.

La enfermedad está marcada por una amplia gama de disfunciones del sistema, una tasa elevada de sedimentación de eritrocitos y la formación de células LE en la sangre o en la médula ósea.^{1-4,6}

Las variaciones en el gen ITGAM, que codifica la cadena CD11b de la integrina Mac-1 (alphaMbeta2; CD11b / CD18; receptor-3 del complemento), es uno de los factores de riesgo genético más fuertes para el lupus eritematoso sistémico (LLE).

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD11b se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD11b. 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.

- 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 de sangre venosa debe hacerse en tubos de recolección de sangre usando el anticoagulante apropiado (EDTA o heparina)^{7,8}. 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	Mouse IgG2a	ICIGG2APE-50UG
APC		ICIGG2AA-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 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 CD11b 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 CD11b para estimar y corregir la unión no específica de los leucocitos (*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.

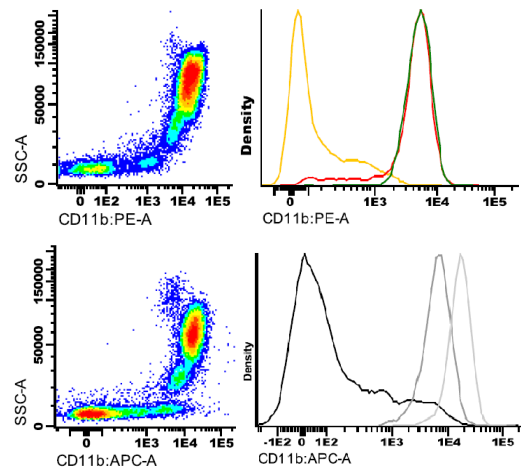


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de sangre periférica normal marcada con CD11b y su complejidad interna (SSC). A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma.

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^{59,10,11}.

Los valores obtenidos de individuos sanos podrían variar entre distintos laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.

CARACTERÍSTICAS

ESPECIFICIDAD

CD11b se expresa en granulocitos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, células NK y subconjuntos de células T y B. La expresión de CD11b aumenta en los granulocitos activados.

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 de isotipico adecuado y el MAb para estudiar.

Las muestras de sangre obtenidas de donantes sanos normales de raza caucásica se marcaron con el anticuerpo monoclonal de Immunostep CD11b. Se analizó la fluorescencia no específica identificada por el control isotipico conjugado IgG2a. Las células que contenían plaquetas, linfocitos B y eritrocitos en la región positiva de CD11b se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de marcaje de antígeno de superficie celular para citometría de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

PE	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación strd.
% control isotipico	10	0,10	1,44	0,58	0,40
% Platquetas	10	0,06	0,27	0,16	0,07
% Eritrocitos	10	0,04	0,28	0,10	0,07
Validos N (lista)	10				
APC	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación strd.
% control isotipico	10	0,21	1,18	0,38	0,28
% Platquetas	10	0,08	0,40	0,20	0,11
% Eritrocitos	10	0,18	0,98	0,39	0,28
Validos N (lista)	10	0,26	1,70	0,78	0,49
Valid N (listwise)	10				

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD11b se determinó marcando la línea celular U937 como población positiva y la línea celular Nalm-6 como población negativa. 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.

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^b

	R	R ²	Ajustada R ²	Error estandar de la estimacion	Regression lineal
PE	0,994 ^a	0,988	0,987	3,972988	y = 1,078x - 3,566
APC	0,993	0,985	0,983	4,52684	y = 1.020x - 2,882

a. Predictivos: (Constante), % Esperados

b. variable Dependiente: % Obtenidos

Los resultados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada. Se demostró sensibilidad a CD11b de 1×10^5 a 1×10^6 células en 1×10^6 células totales.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados de Immunostep, CD11b se determinó realizando 10 replicas de tres rangos de leucocitos: alto, medio y bajo. Se utilizó una muestra de cada rango. Así, se realizaron un total de 10 determinaciones para cada tipo de rango. De este modo 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 3 muestras separadas. Las células CD11b + 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.

PE				
Porcentaje	Media	Desviación strd.	Minimo	Maximo
Alto	77,0560	0,74307	76,22	78,83
Medio	75,3380	0,45697	74,48	75,93
Bajo	62,6180	1,32077	59,94	64,22
APC				
Porcentaje	Media	Desviación strd.	Minimo	Maximo
Alto	77,8050	0,95003	76,20	79,23
Medio	75,4330	0,78103	74,35	77,11
Bajo	74,4510	0,73703	73,45	75,93

Los resultados demuestran una alta reproducibilidad de las mediciones independientemente de los valores de los leucocitos totales.

EXACTITUD o REPETIBILIDAD

Para determinar la repetibilidad del marcaje con este producto, se marcaron 10 muestras diferentes con dos lotes diferentes de este reactivo. Para cada muestra se obtuvieron dos valores diferentes: la intensidad de fluorescencia media (MFI) y el porcentaje de células positivas. Se calcularon la media y la desviación estándar promedio de MFI y el porcentaje de células positivas. Monocitos y neutrófilos CD11b+/CD45 fueron seleccionadas en el análisis.

Los resultados del análisis se muestran en el siguiente cuadro:

PE			
	Media	Media desviación stdr	%CV
% positivas	67,5955	1,6037	2,3724
IMF	7380,7978	467,2896	6,3311
Validos N (lista)	10	10	10
APC			
	Media	Media desviación stdr	%CV
% positivas	72,8929	0,4608	0,6321
IMF	27685,80	3151,9130	11,3845
Validos N (lista)	10	10	10

* Nota: Datos analizados con SPSS para Windows 21

Como se muestra en la tabla, los resultados muestran una excelente repetibilidad de un lote a otro, especialmente para calcular el porcentaje de células positivas en las que el valor está muy por debajo del 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 remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

1. Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKMI/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 1983;158:1785-1803.
2. Corbi AL, Larson RS, Kishimoto TK, Springer TA, Morton CC. Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. Identification of a gene cluster involved in cell adhesion. *J Exp Med* 1988;167:1597-1607.

3. Fagerholm SCI, MacPherson M, James MJ, Sevier-Guy C, Lau CS. The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2013 Jun;22(7):657-63.
4. Patarrayo M, Prieto J, Beatty PG, Clark EA, Gahmberg CG. Adhesion-mediating molecules of human monocytes. *Cell Immunol* 1988;113:278-89.
5. Rhein PI, Mitlohner R, Basso G, Gaipa G, Dworzak MN, Kirschner-Schwabe R, Hagemeyer C, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD, Karawajew L, Rätei R. CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3763-71.
6. Graf MI, Reif S, Kröll T, Hecht K, Nuessler V, Schmetzer H. Expression of MAC-1 (CD11b) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with an unfavorable prognosis. *Am J Hematol*. 2006 Apr;81(4):227-35.
7. 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.
8. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
9. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
10. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
11. 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

