

# Anti- Humano CD45 (D3/9)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	45FI-100T	100 test
PE	45PEI-100T	100 test
PerCP	45PPI-100T	100 test
APC	45AI-100T	100 test



## DESCRIPCION DEL PRODUCTO

**Otros nombres:** LCA, T200

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal anti-CD45 deriva de la hibridación de células de mieloma de ratón y células T de HPB-ALL leucémica. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

**Uso previsto:** El CD45 conjugado con un fluorocromo es un reactivo de inmunofluorescencia directa de un solo color destinado a la identificación de células de línea linfocítica y mielocítica, tanto en médula ósea como en sangre periférica de muestras normales y patológicas en un citómetro de flujo.

**Clon:** D3/9

**HLDA:** 4to Taller internacional sobre diferenciación de leucocitos humanos, Código WS 825.

**Isotipo:** Ratón IgG1, kappa

**Reactividad:** Humano.

**Fuente:** Sobrenadante procedente de un cultivo invitro de células de un hibridoma celular de ratón.

**Purificación:** Cromatografía de afinidad

**Composición:** Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD45 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)	100 ug in 2 ml	50
PE (R-Phycoerythrin)	50 ug in 2 ml	25
PerCP (Peridinchlorophyll-protein complex)	100 ug in 2 ml	50
APC (Allophycocyanin)	50 ug in 2 ml	25

## USO PROPUESTO.

El CD45, clon D3/9 de Immunostep, es un anticuerpo monoclonal destinado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de granulocitos en muestras humanas, células NK, linfocitos y macrófagos que expresan CD45 por citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

Este marcador puede ser utilizado por sí solo o en combinación con otros marcadores para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes, leucemias.

El anticuerpo CD45 se ha utilizado en inmunohistoquímica para estudiar los efectos del constituyente plasmático natural recuperado de pacientes diabéticos tipo 2 (dm-LDL) en células

endoteliales y para estudiar la expresión, localización y actividad funcional de TL1A en la enfermedad inflamatoria intestinal.

El anticuerpo anti-CD45 puede usarse para estudiar la expresión de péptidos antimicrobianos y lisozima en células epiteliales del colon de pacientes con colitis ulcerosa.

La detección de isoformas distintas puede distinguir entre las células T las células T de memoria, lo cual es de interés en pacientes con inmunodeficiencia y enfermedades autoinmunes.

La combinación de CD45 con el anticuerpo CD14 en el análisis de muestras de sangre o médula ósea mediante citometría de flujo muestra una expresión variable de estos antígenos en diferentes estudios de poblaciones celulares sobre la función del CD45 individual con potente de actividad inmunosupresora, lo que sugiere que el CD45 puede ser un objetivo útil para el diseño de fármacos.<sup>(1-5)</sup>

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD45 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD45. 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](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.

- 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.
- l) En caso de background, centrifugar el producto a 2000 rpm durante 2 minutos para evitar interferencias.

#### 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>2,3</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		ICIGGIPE-50UG
PerCP		ICIGGIPP-100UG
APC		ICIGGIA-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.

#### ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD45 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 CD45 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 en sangre periférica de un donante sano.

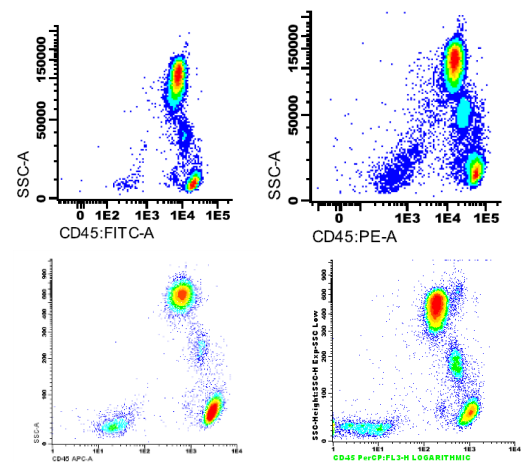


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de leucocitos CD45+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de donante sano.

#### 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.

- 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.
- 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.
- 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>4,5,6</sup>.

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

#### CARACTERÍSTICAS

##### ESPECIFICIDAD

El anticuerpo anti-CD45, clon D3 / 9, se incluyó en los 4tos talleres internacionales sobre diferenciación de leucocitos humanos, código WS 825.

El anticuerpo reconoce todas las isoformas del antígeno CD45 humano (antígeno común de leucocitos), una cadena de proteína única transmembrana tipo I expresada en alto nivel en todas las células de origen hematológico, excepto en eritrocitos y plaquetas.

##### LINEALIDAD

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de Immunostep CD45 se determinó mediante el marcaje de una muestra de sangre periférica de donante sano. Se hicieron diluciones de una muestra de sangre periférica para verificar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas.

Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

Este ensayo proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Modelo	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustada
FITC	,997(a)	,993	,63659
PE	,997 (a)	,994	2,74825
PerCP	,990 (a)	,979	5,12607
APC	,976(a)	,953	7,79558

a Predictores: (constante), esperado

#### REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad para los anticuerpos monoclonales conjugados de Immunostep CD45 se determinó realizando 10 replicas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos CD45 +, alto, medio y bajo. Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD45. De esta manera, se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición.

Las 10 determinaciones para cada rango se realizaron mediante marcaje, procesamiento y análisis de 10 muestras separadas. Los linfocitos fueron seleccionados para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada uno de los tres rangos.

Para realizar este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de un donante normal que expresaba un alto porcentaje de células CD45 +. Las muestras de rango medio y rango bajo se obtuvieron mezclando las células CD45 conocidas en proporciones apropiadas, manteniendo la misma concentración celular total para los tres rangos.

El estudio se realizó en cada uno de tres laboratorios independientes, de la manera en que cada laboratorio obtuvo, marcó y analizó muestras de sangre separadas.

FITC					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Std.
Alto	10	82,87	88,82	86,9900	1,86322
Medio	10	62,56	66,61	64,6730	1,49411
Bajo	10	18,33	20,26	19,3490	,69223
Validos N (lista)	10				
PE					
Alto	10	88,30	95,56	93,7650	2,04913
Medio	10	86,44	89,30	87,6350	,78801
Bajo	10	82,00	85,90	83,7820	1,51770
Validos N (lista)	10				
PerCP					
Alto	10	97,22	99,14	98,7110	,54378
Medio	10	86,24	92,78	89,2460	2,06855
Bajo	10	78,42	89,38	82,2600	3,97419
Validos N (lista)	10				
APC					
Alto	10	29,21	31,01	29,8260	,60768
Medio	10	18,44	19,74	19,1710	,47985
Bajo	10	5,14	6,44	5,7760	,40574
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 remplazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

## REFERENCIAS

1. R Pulido and F Sanchez-Madrid. Biochemical nature and topographic localization of epitopes defining four distinct CD45 antigen specificities. Conventional CD45, CD45R, 180 kDa (UCHL1) and 220/205/190 kDa. The Journal of Immunology, Vol 143, Issue 6 1930-1936
2. Juan M. Zapata, Miguel R. Campanero, Monica Marazuela, Francisco Sanchez-Madrid, and Manuel O. de Landazuri. B-Cell Homotypic Adhesion Through Exon-A Restricted Epitopes of CD45 Involves LFA-1/ICAM-1, ICAM-3 Interactions, and Induces Coclustering of CD45 and LFA-1. Blood, Vol 86, No 5 (September 1), 1995: pp 1861-1872
3. Anne Marie-Cardine, Isabelle Maridonneau-Parini , Siegmund Fischer. Activation and internalization of p56lck upon CD45 triggering of Jurkat cells. European Journal of Immunology. Volume 24, Issue 6 , Pages 1255 – 1261 Published Online: 1 Dec 2005
4. Krensky AM, Sanchez-Madrid F, Robbins E, Nagy JA, Springer TA, Burakoff SJ. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. J Immunol. 1983;131:611-616
5. Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, et al. Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells: a flow cytometric study of normal and pathologic bone marrow samples. Anal Cell Pathol. 1998;16:151-159
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](http://www.immunostep.com)