

Anti-Humano CD9 (VJ1/20)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	9F-100T	100 test
APC	9A-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

Otros nombres: DRAP-27, MRP-1, p24, CD9 antigen, 5H9 antigen, Cell growth-inhibiting gene 2 protein, Leukocyte antigen MIC3, Motility-related protein, MRP-1, Tetraspanin-29, Tspan-31

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD9 procede de células y tejidos derivados de amígdala humana.

Clon: VJ1/20

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-CD9 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)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	50 ug en 2 ml	25
APC (Allophycocyanin)	25 ug en 2 ml	12,5

USO RECOMENDADO

El CD9 clon VJ1/20 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de plaquetas de muestras humanas que expresen CD9 por citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

El anticuerpo monoclonal CD9 inhibe la infección por FIV y CDV (virus del moquillo canino) pero el CD9 no se une directamente al virus, lo que sugiere un papel como co-receptor viral, como ocurre con la toxina de la difteria.

El anticuerpo monoclonal CD9 se ha utilizado para inmunofenotipificación de leucemias y purga de médula ósea en trasplantes autólogos de médula ósea

La expresión de CD9 está correlacionada inversamente con la metástasis en el melanoma y el cáncer de mama

La expresión de CD9 está correlacionada inversamente con la supervivencia actuarial en el cáncer de pulmón.

Se ha demostrado que la transfección de CD9 en células de melanoma murino reduce la metástasis.¹⁻³

PRINCIPIOS DEL TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD9 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD9. Para identificar estas células, la muestra se incuba con el anticuerpo y se analiza mediante citometría 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.

- r) 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)^{4,5}. 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 IgG2a	ICIGG2AF-100
APC		ICIGG2AA-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

PREPARACION DE LA MUESTRA:

- Centrifugar un tubo de sangre recién extraída con EDTA (600 rpm o 75 xg, 20')
- Retirar las plaquetas (capa superior) y lavar dos veces con PBS y BSA al 2%. Volver a resuspender en PBS.
- Agregar el volumen apropiado del anticuerpo y mezclar suavemente con un vortex. El volumen óptimo debe ser determinado por cada laboratorio individualmente.
- Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos.
- El control negativo recomendado es un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo (consulte los materiales requeridos pero no suministrados).
- Agregar 2 mL 0.01 mol/L de PBS (preferiblemente con albúmina de suero bovino al 2%) y resuspender las células usando un vortex.
- Centrifugar a 1000 x g durante 5 minutos. Aspirar suavemente el sobrenadante y desécharlo dejando aproximadamente 50 µL de líquido.

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.

ANALISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD9 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 CD9 para estimar y corregir la unión no específica (*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.

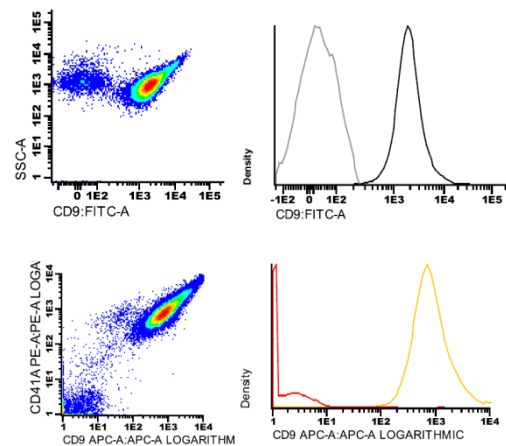


Fig. 1: A la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de plaquetas CD9 + y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 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.
- 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^{6,7,8}

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 antígeno se expresa en eosinófilos, granulocitos, monocitos y numerosas células estromales.

Este anticuerpo reacciona inmunohistoquímicamente en secciones congeladas de plaquetas, monocitos y células pre-B con tinción diferencial en tejidos linfoides y epiteliales.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones de células), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, se tiñeron con un control isotópico adecuado y se estudió el anticuerpo monoclonal. Se evaluó el porcentaje de plaquetas y eritrocitos marcados con el mencionado anticuerpo monoclonal.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

		Plaquetas	Eritrocitos
APC	N	10	10
	Validos		
	Perdidos	0	0
	Media	97,6780	26,5090
	Mediana	98,4950	24,8450
	Moda	92,93 (a)	,00 (a)
	Desviación std.	2,18925	19,34248
	Varianza	4,79280	374,13157
Rango	6,61	51,39	
FITC	N	10	10
	Validos		
	Perdidos	0	0
	Media	96,9820	5,6750
	Mediana	97,7500	4,0950
	Moda	92,36 (a)	1,19 (a)
	Desviación std.	1,86282	4,36708
	Varianza	3,47008	19,07138
Rango	6,64	14,46	

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep, CD9 se determinó marcando una muestra de sangre de un donante normal. 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.

Para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas variaciones (pero deliberadas). Los datos proporcionan una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Modelo	R	R ²	R ² ajustada	Error estandar de la estimacion
APC	0,999 (a)	0,998	0,998	1,30586
FITC	0,984 (a)	0,969	0,964	5,32595

(a) Predicción: (Constante), Obtenidos

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep, CD9 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD9 +, alto, medio y bajo. Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD9. 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. Las plaquetas 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 un donante normal que expresa un alto porcentaje de células CD9 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD9 conocidas en proporciones apropiadas, mientras se mantenía la misma concentración celular total para los tres rangos.

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

		N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion stdr.
APC	Altos	10	97,70	98,82	98,34	0,37
	Medios	10	97,15	98,02	97,72	0,25
	Bajos	10	95,88	97,14	96,45	0,37
	Validos N (lista)	10				
FITC	Altos	10	71,86	77,75	74,06	0,63
	Medios	10	63,34	69,41	67,74	0,29
	Bajos	10	61,28	63,63	62,5	0,10
	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. Li N, Goodall AH, Hjemdahl P. Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. *Cytometry* 1999 Feb 1;35(2):154-61.
2. Zeleznik-Le NJ, Metzgar RS. Expression of CD9 antigen on normal activated human B cells. *Cell Immunol* 1989 Oct 1;123(1):70-82.
3. Zola H, Furness V, Barclay S, Zowtyj H, Smith M, Melo JV, et al. The p24 leucocyte membrane antigen: modulation associated with lymphocyte activation and differentiation. *Immunol Cell Biol* 1989 Feb;67 (Pt 1):63-70.
4. 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.
5. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
6. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
7. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
8. 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