

# Anti-Humano CD21 (HI21a)

| Fluorocromo | Referencia | Test     |
|-------------|------------|----------|
| FITC        | 21F-100T   | 100 test |
| PE          | 21PE-100T  | 100 test |



## DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

**Otros nombres:** Complement receptor type 2 (Cr2), Complement C3d receptor, Epstein-Barr virus receptor (EBV receptor), C3DR, CR2/CR1, CRB1, C3DR,  
**Descripción:** El anticuerpo monoclonal CD21 deriva de las amígdalas.

**Clon:** HI21a

**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-CD21 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                       | Reactive suministrado | Concentración (µg/ml) |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| FITC (Fluorescein isothiocyanate) | 150 ug in 2 ml        | 75                    |
| PE (R-Phycoerythrin)              | 25 ug in 2 ml         | 12,5                  |

## USO RECOMENDADO

El CD21 de Immunostep, el clon HI21a, es un anticuerpo monoclonal diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de linfocitos de muestras humanas que expresan CD21 mediante citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLINICA

La expresión diferencial de CD21 identifica subconjuntos funcionalmente distintos de células B humanas. Este descubrimiento proporciona información importante sobre el proceso de desarrollo de las células B humanas y tiene implicaciones para la comprensión de los procesos que subyacen a la maduración de células B perturbada en condiciones autoinmunes e inmunodeficientes.<sup>(1-4)</sup>

Publicaciones recientes han demostrado que los subconjuntos de células T que expresan CD21 y CD32 pueden diferir con respecto a la presencia o formas clínicas de la enfermedad de esclerosis múltiple.<sup>(1-4)</sup>

## PRINCIPIOS DEL TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD21 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD21. Para identificar estas células, la muestra se incuba con el anticuerpo y se analiza mediante citometría de flujo.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD1a se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD1a. Para identificar estas células se incuba 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>5,6</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 IgG2a       | ICIGG2AF-100UG        |
| PE          | Ratón IgG2a       | ICIGG2APE-50UG        |

- Centrífuga
- 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 CD21 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 CD21 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.

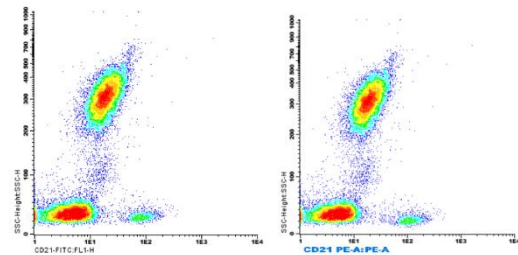


Fig 1. Representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de sangre periférica normal marcada con CD21 y su complejidad interna (SSC).

## 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 período 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<sup>7,8,9</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 CD21 se expresa en linfocitos B. 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 fueron obtenidas de donantes sanos normales de raza caucásica se marcaron con anticuerpo monoclonal Immunostep CD21. Se analizó la fluorescencia no específica identificada por el control isotípico conjugado IgG2a. Las células contenidas en las plaquetas, eritrocitos, monocitos y regiones de linfocitos T se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un protocolo de marcaje de inmunofluorescencia directa de antígenos de membrana para citometría de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Estadística descriptiva

|                     | N  | Minimo | Maximo | Media   | Desviacion std. |
|---------------------|----|--------|--------|---------|-----------------|
| % control isotípico | 10 | 0,02   | 0,85   | 0,3110  | 0,27307         |
| % Plaquetas         | 10 | 0,04   | 2,84   | 0,5430  | 0,83375         |
| % Eritrocitos       | 10 | 0,00   | 0,09   | 0,0360  | 0,02914         |
| % T Linfocitos      | 10 | 5,05   | 32,16  | 17,6330 | 7,88625         |
| % Monocitos         | 10 | 0,00   | 0,33   | 0,1800  | 0,11363         |
| Validos N (lista)   | 10 |        |        |         |                 |
| % control isotípico | 10 | 0,01   | 0,44   | 0,112   | 0,13677         |
| % Plaquetas         | 10 | 0      | 0,06   | 0,008   | 0,01874         |
| % Eritrocitos       | 10 | 0      | 0,01   | 0,005   | 0,00527         |
| % T Linfocitos      | 10 | 0,02   | 0,17   | 0,083   | 0,0499          |
| % Monocitos         | 10 | 0      | 0,05   | 0,009   | 0,01524         |
| Validos N (lista)   | 10 |        |        |         |                 |

### SENSIBILIDAD

La linealidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD21 se determinó realizando diluciones entre la línea celular Ramos y la línea celular Jurkat en proporción conocida. Las células se mezclaron en diferentes proporciones con un número final constante de  $1 \times 10^6$  células para lograr diferentes relaciones celulares de 0% de células positivas a 100%. Proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Las células se incubaron con el anticuerpo a 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. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

| resumen del modelo <sup>b</sup> |                |                         |                                 |                      |
|---------------------------------|----------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------|
| R                               | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> ajustada | Error estandar de la estimación | Regression lineal    |
| FITC                            |                |                         |                                 |                      |
| 0,999 <sup>a</sup>              | 0,999          | 0,999                   | 0,999                           | y = 1,016x + 0,158   |
| PE                              |                |                         |                                 |                      |
| 0,992 <sup>a</sup>              | 0,984          | ,982                    | ,13870                          | y = 0,9325x - 0,0313 |

a. Variable dependiente: % Esperados  
b. Predictores: (Constante) % Obtenidos

Los resultados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada. Se demostró la linealidad de CD21 de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células en  $1 \times 10^6$  células totales.

### REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados CD21 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 porcentaje. De esta manera, se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición.

Las 30 determinaciones para cada rango se realizaron mediante el marcaje, el procesamiento y el análisis de 3 muestras separadas. Los linfocitos CD21 + 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.

| Estadística descriptiva |                      |    |         |         |           |                 |
|-------------------------|----------------------|----|---------|---------|-----------|-----------------|
| Rango                   |                      | N  | Minimo  | Maximo  | Media     | Desviacion std. |
| Altos                   | Porcentaje           | 10 | 28,24   | 30,92   | 29,5800   | ,68882          |
|                         | IMF                  | 10 | 1695,00 | 1762,00 | 1726,5000 | 20,12875        |
|                         | Validos N (listwise) | 10 |         |         |           |                 |
| Medios                  | Porcentaje           | 10 | 23,74   | 27,89   | 24,7440   | 1,15171         |
|                         | IMF                  | 10 | 1631,00 | 1672,00 | 1644,1000 | 14,01150        |
|                         | Validos N (lista)    | 10 |         |         |           |                 |
| Bajos                   | Porcentaje           | 10 | 9,75    | 10,30   | 10,0480   | ,19418          |
|                         | IMF                  | 10 | 1285,00 | 1385,00 | 1342,1000 | 25,79599        |
|                         | Validos N (lista)    | 10 |         |         |           |                 |

\*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 replazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

## REFERENCIAS

1. Santi Suryani, David A. Fulcher, Brigitte Santner-Nanan, Ralph Nanan, Melanie Wong, Peter J. Shaw, John Gibson, Andrew Williams, and Stuart G. Tangye. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* 2010 115: 519-529.
2. Z. Kuzmina, K. Krenn, V. Petkov, U. Kormoczi, R. Weigl, A. Rottal, P. Kalhs, M. Mitterbauer, L. Ponhold, G. Dekan, H. T. Greinix, and W. F. Pickl. CD19+CD21 low B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. *Blood* (2013) 121: 1886
3. Hui Zhi Low, Dorothee Hilbrans, Ingo G. H. Schmidt-Wolf, and Harald Illges. Enhanced CD21 expression and shedding in chronic lymphatic leukemia: a possible pathomechanism in disease progression. *International Journal of Hematology* (2012) 96: 350
4. Manabu Tomita, Takafumi Kadono, Norihito Yazawa, Tomohiko Kawashima, Zenshiro Tamaki, Ryuichi Ashida, Hanako Ohmatsu, Yoshihide Asano, Makoto Sugaya, Masahide Kubo, Hironobu Ihn, Kunihiko Tamaki, and Shinichi Sato. Serum levels of soluble CD21 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology International* (2012) 32: 317
5. 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.
6. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
7. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
8. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
9. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 60:190-208 (1991)

## MANUFACTURED BY



**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)