

# Anti-Humano CD3 – CD8- CD45- CD4 (33-2A3-143-44-D3/9- HP2/6)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC/PE/PerCP/APC	3F18PE145PP14A-50T	50 test



## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal anti-CD3/CD8/CD45/CD4 deriva de leucocitos humanos (CD3), la hibridación de células de mieloma SP2 de ratón y células de bazo de ratones BALB/c inmunizadas con linfocitos T humanos (CD8), células T de HPB-ALL leucémica (CD45 y CD4).

**Clones:** 33-2A3, 143-44, D3/9, HP2/6

**HLDA:** CD3 → 2<sup>nd</sup> Talleres Internacionales sobre Diferenciación de Leucocitos Humanos

CD8 → 4<sup>th</sup> Talleres internacionales sobre diferenciación de leucocitos humanos, Código WS 169

CD45 → 6<sup>th</sup> Talleres Internacionales sobre Diferenciación de Leucocitos Humanos, Código WS N-L103

CD4 → 4<sup>th</sup> Talleres Internacionales sobre Diferenciación de Leucocitos Humanos, Código WS 116.

**Isotipos:** Mouse IgG2a, IgG1, IgG1 and IgG2a kappa

**Reactividad:** Humano

**Fuente:** Sobrenadante procedente de un *cultivo celular in vitro* de un hibridoma celular.

**Purificación:** Cromatografía de afinidad.

**Composición:** Anticuerpo monoclonal antihumano CD3/CD8/CD45/CD4 de ratón conjugado con un fluorocromo y en una solución acuosa que contiene proteína estabilizadora y azida sódica al 0,09% (NaN<sub>3</sub>).

Fluorocromo	Reactivo suministrado	Concentración (µg/ml)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	250 µg in 2 ml	12,50
PE (R-Phycoerythrin)	510 µg in 2 ml	2,55
PerCP (Peridin-cholophyll-protein complex)	50 ug in 2 ml	25
APC (Allophycocyanin)	10 ug in 2 ml	5

## USO RECOMENDADO

El anticuerpo monoclonal CD3/CD8/CD45/CD4 de Immunostep, clones 33-2A3, 143-44, D3/9 y HP2/6 es usado para el diagnóstico *in vitro* en la identificación y enumeración de células de muestra de sangre periférica humana que expresan CD3, CD8, CD45 y CD4 en su superficie mediante citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

Los linfocitos supresores/citotóxicos son un subconjunto de linfocitos T (CD3+) que son CD8+. Los porcentajes de linfocitos T supresores/citotóxicos (CD3 + CD8 +) se pueden utilizar para caracterizar y controlar algunas formas de inmunodeficiencia y enfermedades autoinmunes.

El porcentaje de linfocitos supresores/citotóxicos puede estar fuera del rango de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunes y en ciertas reacciones inmunes como la enfermedad aguda de injerto contra huésped (EICH) y el rechazo de trasplantes.

El porcentaje relativo del subconjunto CD8+ está elevado en muchos pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID)(6-9) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

CD45 es fundamental para la activación mediada por el receptor de antígenos de células T y B y es posible para la activación mediada por receptor en otros leucocitos.

Este reactivo puede ser utilizado en los estudios de caracterización para inmunofenotipado de leucocitos, los cuales son ampliamente aplicados en la caracterización y seguimiento de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, leucemias, etc.

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

La identificación de niveles anormales de linfocitos CD4+ puede ser de ayuda en el diagnóstico y/o pronóstico de diversas enfermedades inmunitarias como la agammaglobulinemia, la aplasia tímica (síndrome de DiGeorge), la inmunodeficiencia combinada grave y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del SIDA, resulta en una profunda inmunosupresión debido principalmente a una reducción selectiva de los linfocitos CD4+ que expresan el receptor del virus (antígeno CD4). El progresivo deterioro clínico e inmunológico generalmente corresponde a una disminución en el recuento de linfocitos CD4+.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD3/CD8/CD45/CD4 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD3,CD8,CD45 y CD4. 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 2º-8º 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.



- a) 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. Ficha de datos de seguridad (FDS) disponible en la web [www.immunostep.com](http://www.immunostep.com)
- b) Evitar contaminación microbiana del reactivo.
- c) 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.

#### 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>1,2,3</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	Immunostep referencia
FITC	Ratón IgG2a	ICIGG2AF-100UG
PE	Ratón IgG1	ICIGG1PE-50UG
PerCP	Ratón IgG1	ICIGG1PP-100UG
APC	Ratón IgG2a	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 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 CD3/CD8/CD45/CD4 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 CD3/CD8/CD45/CD4 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 e incluir las células marcadas correctamente.

A continuación se muestra un ejemplo de representación del marcaje en sangre periférica de un donante sano siguiendo el protocolo descrito en el punto anterior.

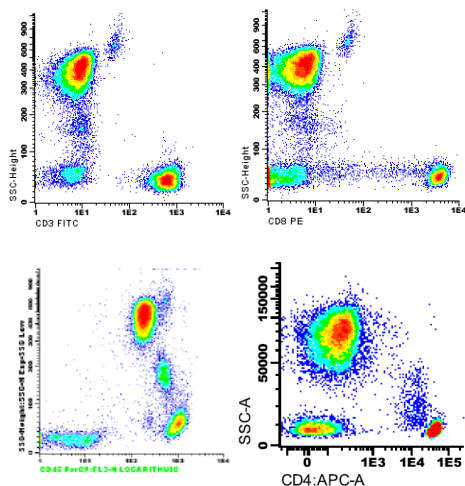


Fig. 1: Diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de leucocitos CD3+, CD8+, CD45+ y CD4+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano.

**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.
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.
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>4,5</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

Las muestras de sangre se obtuvieron de donantes normales sanos de raza caucásica y se marcaron con el anticuerpo monoclonal Immunostep CD3 FITC. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre fueron procesadas por un método de leucocitos, con tinción de inmunofluorescencia directa para análisis de citometría de flujo.

Para evaluar la Especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones celulares), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, teñidas con un control de isotipo adecuado y el MAb a estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con el citado MAb. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

**Resumen CD3+**

	% linfocitos	% monocitos	% granulocitos
1	64,99	1,10	,64
2	73,46	7,45	,56
3	51,29	7,00	,35
4	88,18	1,24	,71
5	70,27	12,70	,47
6	82,98	,21	,06
7	85,46	6,47	1,51
8	80,42	2,61	2,04
9	64,19	2,63	,50
10	64,72	7,10	,65
Total N	10	10	10
Media	72,5960	4,8510	,7490
Mediana	71,8650	4,5500	,6000
Minimo	51,29	,21	,06
Maximo	88,18	12,70	2,04
Desv.Tip.	11,68110	3,93365	,58485
Varianza	136,448	15,474	,342

**Resumen (gate en linfocitos)**

		% Linf. CD3+	% Linf. CD3+/CD4+	% Linf. CD3+/CD8+
1		64,99	58,89	22,25
2		73,46	39,57	24,72
3		51,29	30,97	14,73
4		88,18	71,68	14,86
5		70,27	55,82	34,51
6		82,98	62,22	26,28
7		85,46	70,40	18,85
8		80,42	37,74	20,60
9		64,19	50,88	36,54
10		64,72	62,15	13,09
Total	N	10	10	10
	Media	72,5960	54,0320	22,6430
	Mediana	71,8650	57,3550	21,4250
	Minimo	51,29	30,97	13,09
	Maximo	88,18	71,68	36,54
	Varianza	136,448	195,053	64,962
	Desv. tip.	11,68110	13,96613	8,05991

**SENSIBILIDAD**

La sensibilidad se evaluó dentro de una concentración de glóbulos blancos (WBC) de 0,2 x 10<sup>3</sup> a 20 x 10<sup>3</sup> WBC/μl y una concentración de linfocitos de 0,1 x 10<sup>3</sup> a 9,0 x 10<sup>3</sup> células y una concentración de linfocitos/ μl de 0,1 x 10<sup>3</sup> a 9 x10<sup>3</sup> linfocitos/ μl. Se observó que los resultados eran lineales dentro del rango CD3+ CD4+, el rango CD3+ CD8+ y el rango CD3+.

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales Immunostep CD3 FITC/ CD8 PE/ CD45 PerCP/ CD4 APC se comprobó en la escala de concentración de las células teñidas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

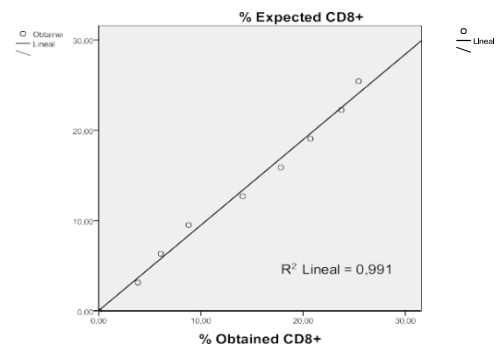
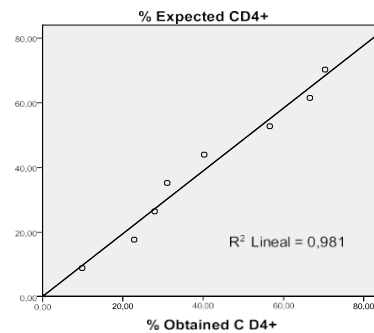
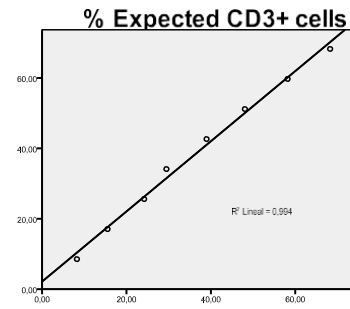
Determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado frente a pequeñas variaciones (pero deliberadas). proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

**Resumen de casos**

	muestra	Dilucion	% Esperados	% Obtenidos
1	400A + 0B	100,0	68,26	68,26
2	350A + 50B	87,5	59,72	58,18
3	300A + 100B	75,0	51,18	48,06
4	250A + 150B	62,5	42,65	38,98
5	200A + 200B	50,0	34,12	29,46
6	150A + 250B	37,5	25,59	24,18
7	100A + 300B	25,0	17,06	15,51
8	50A + 350B	12,5	8,53	8,25
9	0A + 400B	,0	,00	.
Total	N	9	9	9

Modelo	R	R cuadrado	Rcuadrado ajustada	Error std. de estimación
1	,997(a)	,994	,993	1,177019

a Predictors: (Constante), Obtenido



### REPRODUCIBILITY

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados con CD3 FITC/CD8 PE y CD3 FITC/CD4 APC de Immunostep se determinó realizando 9 determinaciones repetidas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de linfocitos, alto, medio y bajo.

Así, se realizaron un total de 27 determinaciones para cada forma de linfocitos. De esta manera, se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición. Las 9 determinaciones para cada rango se realizaron mediante marcado, procesamiento y análisis de 9 muestras separadas. Se seleccionaron linfocitos 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, medio y bajo porcentaje de linfocitos. 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.

#### Resumen CD3+

	% Alto	% Medio	% Bajo
1	69,64	67,02	56,00
2	69,78	63,14	56,57
3	69,56	64,64	59,17
4	58,45	63,03	52,86
5	68,73	63,69	56,52
6	69,51	64,85	52,94
7	69,47	64,92	52,63
8	68,48	65,40	49,33
9	69,38	63,58	52,00
Total	N	9	9

#### Reproducibilidad CD3+

		% Alto	% Medio	% Bajo
N	Valido	9	9	9
	perdido	0	0	0
Meadia		68,1111	64,4744	54,2244
Mediana		69,4700	64,6400	52,9400
Moda		58,45 <sup>a</sup>	63,03 <sup>a</sup>	49,33 <sup>a</sup>
Desv. Std.		3,64849	1,27407	3,02778
Varianza		13,311	1,623	9,167
Rango		11,33	3,99	9,84
Minimo		58,45	63,03	49,33
Maximo		69,78	67,02	59,17

Reproducibilidad CD3+/CD4+				
		% Alto	% Medio	% Bajo
N	Valido	9	9	9
	Perdido	0	0	0
Media		55,6089	59,1933	58,6244
Mediana		55,4400	59,4900	59,7900
Moda		53,77	54,74	54,61
Desv. Std.		1,28043	2,54627	2,26331
Varianza		1,640	6,484	5,123
Rango		3,35	7,43	5,87
Minimo		53,77	54,74	54,61
Maximo		57,12	62,17	60,48

#### Reproducibilidad CD3+/CD8+

		% Alto	% Medio	% Bajo
N	Valido	9	9	8
	Perdido	0	0	1
Media			33,0311	37,3213
Mediana			33,3000	37,8750
Moda			25,48	40,00
Desv. Std.			4,62543	3,66363
Varianza			21,395	13,422
Rango			12,27	9,57
Minimo			25,48	33,29
Maximo			37,75	42,86

### 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. 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.
2. 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.
3. Orfao A, Ciudad J, López-Berges MC, López A, Vidriales B, Caballero MD. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymph* 1994;13:87-90..
4. Piatier-Tonneau D. CD Guide. CD4. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 750-51.
5. Mason DY, Cordell JL, Gaulard P, Tse AGD, Brown MH. Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. *J Clin Pathol* 1992;45:1084-8.
6. Nuckols JD, Shea CR, Horenstein MG, Burchette JL, Prieto VG. Quantitation of intraepidermal T-cell subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue helps in the diagnosis of mycosis fungoides. *J Cutan Pathol* 1999;26:169-75.
7. 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
8. 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
9. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London:Oxford University Press; 1999. p. 49-50.
10. Piatier-Tonneau D. CD Guide. CD4. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 750-51.

## 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)